بسم الله الرحمن الرحیم

مجله میکروب شناسی پزشکی ایران

فصلنامه : سال ۱، شماره ۱، بهار ۱۳۸۶

ISSN: 1735 - 8612

صاحب امتیاز :
انجمن علمی میکروب شناسی ایران

مدیر مسئول :
دکتر عبداله کریمی

سردبیر :
دکتر عبدالعزیز رستگار لاری

جانشین سردبیر :
دکتر پرویز اولیاء

مدیر اجرایی :
دکتر محمدرضا پورمند

مدیر امورمالی :
دکتر غلامرضا ایراجیان

ویراستاران :
دکتر آذردخت خسروی
دکتر محمد مهدی فیض آبادی

هیات تحریریه (به ترتیب حروف الفبا) :
دکتر عبدالوهاب البرزی، استاد دانشگاه علوم پزشکی شیراز
دکتر پرویز اولیاء، دانشیار دانشگاه علوم پزشکی شاهد
دکتر محمدرضا پورشفیع، دانشیار انستیتو پاستور ایران
دکتر محمدرضا پورمند، استادیار دانشگاه علوم پزشکی تهران
دکتر محبوبه حاج عبدالباقی، دانشیار دانشگاه علوم پزشکی تهران
دکتر آذردخت خسروی، دانشیار دانشگاه علوم پزشکی اهواز
دکتر عبدالعزیز رستگار لاری، استاد دانشگاه علوم پزشکی ایران
دکتر حمید عبدالهی، دانشیار دانشگاه علوم پزشکی کرمان
دکتر فاطمه فلاح، دانشیار دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی
دکتر محمد مهدی فیض آبادی، دانشیار دانشگاه علوم پزشکی تهران
دکتر عبداله کریمی، استاد دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی
دکتر اکبر میرصالحیان، دانشیار دانشگاه علوم پزشکی تهران
دکتر محمدرضا نهائی، استاد دانشگاه علوم پزشکی تبریز
دکتر کیومرث قاضی سعیدی، استاد میکروب شناسی

داوران این شماره (به ترتیب حروف الفبا) :
دکتر پرویز اولیاء، دکتر محمدرضا پورشفیع،
دکتر محمدرضا پورمند، دکتر طاهره پیروز،
دکتر ایرج رسولی، دکتر فریده زینی،
دکتر حوریه صادری، دکتر بهرام فتح الله زاده،
دکتر کیومرث قاضی سعیدی، دکتر امیر مظفری،
دکتر اشرف مجتبی مبارز، دکتر اکبر میرصالحیان،
دکتر محمد نیاکان، دکتر محمد حسین یادگاری

کارشناس مجله : سارا مصممی
نشانی : تهران، صندوق پستی ۷۱۵-۱۴۵۱۵
تلفکس : ۸۸۹۸۵۷۳۳
پست الکترونیک : jmicrobiology@gmail.com
آدرس سایت : www.ism.ir

طراحی و چاپ :
گروه فیروز تجارت
شمارگان : ۱۰۰۰ نسخه
قیمت : ۲۰۰۰۰ ریال

فهرست مندرجات

بررسی کارآئی روش ایمنوفلورسانس غیرمستقیم در تشخیص نوکاردیا ۱
سید سعید اشراقی*، عبدالفتاح صراف نژاد، شهناز مزده ، نازیلا اساسی

بررسی شیوع ژن های آنزیم های تغییر دهنده آمینوگلیکوزیدها در *انتروکوکوس فکالیس* و *انتروکوکوس فسیوم* در ایران ۱۱
محمد مهدی فیض آبادی*، سارا صیادی، لیلا شکرزاده، سپیده خطیبی ،سارا غروی

شناسایی موتاسیون های ژن*rpoB* در سویه های *مایکوباکتریوم توبرکلوزیس* مقاوم به ریفامپین جدا شده از بیماران ایرانی ۱۷
فرحنوش دوستدار* ، آذر دخت خسروی ، پریسا فرنیا ، احمد رضا بهره مند.

جدا سازی سویه های *سودوموناس آئروژینوزا* تولید کننده متالوبتالاکتاماز از بیماران مبتلا به عفونتهای سوختگی و شناسایی ژنهای bla_{IMP} bla_{VIM} با روش PCR ۲۳
فاطمه میهنی ،آذر دخت خسروی*

بررسی وجود ژن *aac(6')-le-aph(2")-la* در سویه های *انتروکوکوس فکالیس* و *انتروکوکوس فیسیوم* چند مقاومتی و مقاوم به مقادیر بالای جنتامایسین ۳۳
مهناز سیفی، محمد رضا پورشفیع، کتایون برهانی، فاتح رحیمی، محمد مهدی سلطان دلال*

مقایسه اثر ضد میکروبی رسپیتول B حاوی منتول و اسانس اکالیپتوس با منتوفین،منتول،اسانس اکالیپتوس ۳۹
محدثه محبوبی*، محمد اکبری، قاسم حقی، نسترن کاظم پور

شناسایی ژنوم مایکوپلاسما در اسپرم مردان نابارور به روش PCR ۴۷
دکترعلی اکبرسلیمانی رهبر*، مریم گلشنی، دکترفریبا فیاض ،دکتر صدیقه رفیعی طبا طبایی ، دکتر آرزو مرادی

تعیین عیارسرمی آنتی بادی های اختصاصی بر علیه *مایکو پلاسما پنومونیه* ، *کلامیدیا پنومونیه* و *لژیو نلا پنوموفیلا* در زائرین ایرانی در طی مناسک حج تمتع سال ۱۳۸۳ ۵۵
دکتر اکبر میرصالحیان*، دکتر سید منصور رضوی، دکتر حسین ضیایی اردکانی، کبری بامداد، سید محمد میر افشار، فرزانه باذرجانی

مزایای تشخیص سریع مننژیت باکتریایی به‌روش مولکولی در مقایسه با کشت و مشاهده مستقیم میکروسکوپی مایع نخاع ۶۱
رمضانعلی عطایی* ، علی مهرابی توانا ، زهرا سفیری، علی کرمی، مرتضی ایزدی ، سید محمد جواد حسینی

ارزیابی مقاومت آنتی بیوتیکی باسیلهای گرم منفی جدا شده از کودکان مراجعه کننده به بیمارستان کودکان مفید تهران ۶۷
دکتر عبدالعزیز رستگارلاری* ، دکتر عبدالله کریمی ، شبنم رضوی ، دکتر سید حمید مصطفوی ، دکتر غلامحسین فرزندی

بررسی شیوع *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم به متی سیلین (MRSA) در بیمارستان امیراعلم ۷۱
دکتر مهرداد حسیبی*، بابک مهاجر ایروانی، دکتر مهناز سیفی، دکتر سیروس جعفری، دکتر محمد هادی زاده نیسانقلب، دکتر بزمان سعادت آملی

شرایط تهیه و ارسال مقاله

مجله میکروب شناسی پزشکی ایران هر سه ماه یکبار تازه ترین مطالب و نوآوری های علمی و پژوهشی اعم از علوم پایه ، بالینی، نقد علمی و گزارش موارد جالب و نادر علوم پزشکی را چاپ و منتشر میکند . پذیرش و چاپ مقالات رسیده به دفتر مجله بستگی به نظر هیأت تحریریه و قضاوت دانشمندان و متخصصین دانشگاهی داخل و خارج از کشور دارد . مسوولیت کامل منابع و مطالب مندرج در مقالات از دیدگاه علمی، اخلاقی و حقوقی بر عهده نویسندگان آنهاست . هیأت تحریریه مجله در پذیرش یا رد و ویرایش مقالات آزاد است . نقل مطالب « مجله میکروب شناسی پزشکی ایران» با ذکر مأخذ مانعی ندارد .

مجله میکروب شناسی پزشکی ایران از پذیرش مقالاتی که قبلاً در نشریات فارسی زبان دیگری چاپ شده یا تحت بررسی باشند ، معذور است . نویسندگان مقالات باید در نامه خود به سر دبیر مجله به این نکته اشاره کنند که مقاله به صورت همزمان برای مجله دیگری ارسال نشده و در مجله دیگری قبلاً به چاپ نرسیده است . رعایت اخلاق در تحقیقات بالینی یا حیوانی کاملاً الزامی بوده و توجه به محرمانه بودن اطلاعات بیماران و ملحوظ نمودن شرایط تحقیق بر روی حیوانات ضروری است .

از نویسندگان مقالات خواهشمند است جهت تهیه و ارسال مقالات به موارد ذیل توجه فرمایند :

بند ۱) مقاله باید بر یک روی کاغذ با قطع ۲۹ *۲۱ سانتیمتر (A4) و رعایت فاصله ۳ سانتیمتر از طرفین و فاصله سطر های متن دوبل باشند و با استفاده از نرم افزار رایانه ای Word 2000 تهیه و در چهار نسخه که در یکی از آنها مشخصات کامل نویسنده یا نویسندگان درج شده باشد و سه نسخه دیگر فاقد مشخصات نویسندگان باشد همراه با دیسکت رایانه ای به دفتر مجله میکروب شناسی ایران فرستاده شود . (ارسال مقاله بصورت فایل word از طریق **email:jmicrobiology@gmail.com** نیز قابل قبول می باشد)

اصل مقاله (فارسی)

عنوان مقاله : یاقوت ١٦ (بولد)

نام نویسندگان : یاقوت ١٢

چکیده : یاقوت ١٤ (بولد)

عنوان چکیده : یاقوت ١١ (بولد)

متن چکیده : یاقوت ١١

متن مقاله : لوتوس ١١

عناوین متن مقاله : یاقوت ١٤ (بولد)

ABSTRACT (English)

Title : Times New Roman 14 (Bold)

Author: Times New Roman 10 (Bold)

Address: Times New Roman 10 (Bold)

Text: Times New Roman 11

بند ۲) نام و نام خانوادگی ، رتبه علمی ، نشانی کامل پستی، آدرس الکترونیکی ، شماره تلفن نویسنده یا نویسندگان مقاله و مؤلف رابط ، عنوان و تاریخ ارسال مقاله در صفحه اول قید شود .

بند ۳) در صورتی که تعداد نویسندگان بیش از یک نفر باشد ، باید قید شود که مقاله با همکاری همه مؤلفین تهیه ، خوانده و تأیید شده است .

مجله میکروب شناسی پزشکی ایران از مقالات پژوهشی گروهی استقبال میکند .

بند ٤) مقالات باید شامل **عنوان، چکیده، مقدمه، مواد و و روش ها، یافته ها، بحث، نتیجه گیری، تقدیر و تشکر (در صورت لزوم) و فهرست مراجع** (کتابنامه) باشد .

چکیده به فارسی و انگلیسی حداکثر تا ۲۵۰ کلمه و به صورت چکیده های سازمان یافته فارسی(شامل چهار بخش: **زمینه و اهداف، روش بررسی، یافته ها، نتیجه گیری)** و انگـلیسی **(Background and objectives, Material and Methods, Results, Conclusion)** و ۳ الی ۵ کلمه کلیدی (**کلید واژه ها**) از واژه های فهرست MeSH در اندکس مدیکوس باشد . گزارشهای موردی شامل **چکیده** غیر سازمان یافته حداکثر تا ۱۰۰ کلمه (به فارسی و انگلیسی) ، **کلید واژه ها ، مقدمه ، گزارش مورد و بحث تفصیلی و فهرست مراجع** خواهد بود .

بند ۵) مراجع باید به ترتیب استفاده در متن مقاله یا جداول و نمودارها شماره گذاری (درون پرانتز) و با همان شماره در فهرست مراجع قید شوند . در تهیه فهرست مراجع باید موارد زیر **بر اساس معاهدات داخلی و بین المللی به دقت مورد توجه قرار گیرند .**

۱-۵) اگر مرجع مجله است به ترتیب باید نام خانوادگی نویسنده یا نویسندگان ، حرف یا حروف اول نام نویسنده یا نویسندگان (و در صورتی که نویسندگان بیش از ٦ نفر باشند از نفر ششم به بعد عبارت *et al.* و در صورت استفاده از مرجع فارسی ، عبارت و همکاران) ، عنوان کامل مقاله ، نام اختصاری مجله (Italic) ، سال انتشار ، شماره مجله (Volume)**(Bold)** و شماره یا شماره های مجله (Numbers) در داخل پرانتز و شماره صفحات ابتدا و انتهای مقاله نوشته شود .

مثال انگلیسی :

Clarke SR, Brummell KJ, Horsburgh MJ, McDowell PW, Mohamad SA, Stapleton MR, *et al*. Identification of *in vivo*-expressed antigens of *Staphylococcus aureus* and their use in vaccinations for protection against nasal carriage. *J Infect Dis* 2006; **193**(8)**:**1098-108.

مثال فارسی :

نوری م ، افراسیابی راد ع ، زهرایی م ، پزشکیان م ، محبوب س ، بغداد چی الف و همکاران . تأثیر رژیم غذایی کم کالری ، کم کلسترول با فیبر بالا و ورزش هوازی بر میزان پلاسمایی ویتامینهای E و C در بیماران مبتلا به انسداد عروقی ،*مجله پزشکی علوم پزشکی و خدمات بهداشتی – درمانی تبریز* ۱۳۷۹ ، سال ۳٤ ، شماره ٤٦ ، صص ٥٥ تا ٦٢ .

۲-۵) سازمان به عنوان مؤلف **;** مثال :

The Cardiac Society of Australia and New Zealand. Clinical exercise stress testing. Safety and performance guidlines. *Med J Aust* 1996: **164**: 282-4

۳-۵) چنانچه نام هیچ مؤلفی ذکر نشود ، گروه مؤلفین مد نظر است **;** مثال :

Cancer in South Africa [editorial]. *S Afr Med J* 1994; 84:15.

۵-۵) مجله همراه با ضمیمه تکمیلی :

Shen HM, Zhang QF. Risk Assessment of nickel carcinogenicity and occupational lung cancer. environ Health perspect 1994; 102 Suppl: 275-82.

٦-۵) اگر مرجع کتاب است ، نام خانوادگی نویسنده یا نویسندگان کتاب ، حرف یا حروف اول نام نویسنده یا نویسندگان ، عنوان کامل کتاب (*Italic*) شماره چاپ ، محل انتشار و نام ناشر ، سال انتشار و شماره صفحات مورد استفاده .

مثال فارسی :

امتیازی گ، کریمی م. *مبانی زیست مولکولی و مهندسی ژنتیک* – چاپ چهارم، اصفهان ، انتشارات مانی، ۱۳۸۲ ، صص ، ۲۱۵ تا ۲۱۹.

۷-۵) چنانچه مرجع بخشی از کتاب باشد ، نام خانوادگی و حرف یا حروف اول نویسنده یا نویسندگان بخش مورد استفاده ، عنوان بخش ، نام خانوادگی و حرف یا حروف اول نام مؤلف یا مؤلفین کتاب ، عنوان کامل کتاب (Italic) ، شماره چاپ ، محل و نام ناشر ، سال انتشار و شماره صفحات بخش مورد استفاده .

مثال انگلیسی :

Kastner DL. Intermittent and Periodic Arthritic Syndromes. In: Koopman W J, ed. *Arthritis and Allied Conditions*: *A Textbook of Rheumatology*. 13th ed. Baltimore; Williams & Wilkins. 1997; PP: 1279-1306.

مثال فارسی :

بهرامی ف ، نوحی ع . کنترل کیفیت آزمایش لیپیدهای سرم. در کتاب : *تضمین کیفیت آزمایشگاهی* ، مؤلفین: محمدی ح و جلیلی ح . چاپ دوم، تهران ، مرکز نشر دانشگاهی ، ۱۳۷۵، صص ۵۰ تا ٦۱ .

۸-۵)رفرانس الکترونیک (مقاله) :

Moynagh J.The evaluations of tests for the diagnosis of transmissible spongiform encephalopathy in bovines. European Commisson, htttp://europa.eu.int/comm/food/fs/bse/bse12_en.html(Accessed May 2005).

۹-۵)رفرانس الکترونیک (سازمان به عنوان مؤلف) :

Food and Drug Administration. Revised preventive measures for blood products, 2001. http://www.fda.gov/ohrms/dockets/ac/01/briefing/3817b1.htm (Accessed May 2002).

بند ٦) تعداد اشکال و جداول نباید جمعاً از چهار مورد تجاوز کند و باید در صفحات جداگانه در آخر مقاله آورده شود. از اشکال (منحنی ها ، نمودارها، تصاویر میکروسکپی ، رادیوگرافی و ...) عکس برقی سیاه و سفید در اندازه(۷۳ *۱۲۷) میلی متر و حداکثر (۲۵٤*۲۰۳) میلی متر تهیه و اصل آن ارسال گردد.

بند ۷) بدون در نظر گرفتن صفحه اول و اشکال و جداول و نمودارها ، تعداد کل صفحات مقاله نباید از ٦ صفحه تجاوز کند .

بند ۸) مجله میکروب شناسی پزشکی ایران از بازگرداندن مقالات تأیید نشده توسط هیئت تحریریه به نویسندگان آنها معذور است . در صورت درخواست کتبی نویسنده رابط ، فقط عکسها و تصاویر اصلی باز گردانده می شود .

بند ۹) مقالات رسیده در صورت تائید داوران در اولویت چاپ قرار می گیرد و پس از چاپ مقاله، سه نسخه از شماره مجله به نویسنده رابط ارسال خواهد شد.

مجله میکروب شناسی پزشکی ایران

سال ۱ شماره ۱ بهار ۱۳۸۶، صفحات ۱ – ۹

بررسی کارآئی روش ایمنوفلورسانس غیرمستقیم در تشخیص نوکاردیا

سید سعید اشراقی[*۱]، عبدالفتاح صراف نژاد[۲]، شهناز مزده[۳]، نازیلا اساسی[۴]

۱) گروه پاتوبیولوژی، بخش میکروب شناسی، دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی تهران

۲) گروه پاتوبیولوژی، بخش ایمنی شناسی، دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی تهران

۳) بیمارستان امام خمینی(ره)، دانشگاه علوم پزشکی تهران

۴) گروه آمار و اپیدمیولوژی، دانشکده بهداشت و انستیتو تحقیقات بهداشتی، دانشگاه علوم پزشکی تهران

نویسنده رابط : سید سعید اشراقی، دانشیار گروه پاتوبیولوژی، بخش میکروب شناسی، دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی تهران

تلفن : ۸۸۹۷۳۶۶۰ همراه : ۰۹۱۲۶۳۶۳۱۳۴ eshraghs@sina.tums.ac.ir

تاریخ دریافت مقاله : ۸۶/۳/۱ تاریخ پذیرش مقاله : ۸۶/۳/۲۲

چکیده :

زمینه و اهداف: نوکاردیوز بیماری عفونی خطرناکی است که معمولاً بواسطه ورود بعضی از گونه های نوکاردیا به دستگاه تنفسی و یا پوست آسیب دیده بوجود می آید. نوع ریوی بیماری شیوع بیشتری داشته و اغلب در اثر استنشاق آئروسل های حاوی نوکاردیا استروئیدس در میزبان مستعّد بوجود می آید، حال آن که نوکاردیا برازیلینسس نیاز به شرایط خاص میزبانی ندارد. جستجوی آنتی بادی در سرم کلیه افراد تحت مطالعه با استفاده از آزمون ایمونوفلوئورسانس غیرمستقیم (IFA)، ضمن اینکه بررسی رابطه سنّ، جنس، شغل، ابتلا به بیماریهای ریوی مزمن و مصرف داروهای کورتیکوستروئید با سطح آنتی بادی بدست آمده علیه نوکاردیا از اهداف دیگر این مطالعه بود.

روش بررسی: این مطالعه بر روی یک جمعیت ۳۰۰ نفری در مجتمع بیمارستانی امام خمینی(ره) تهران و به روش مقطعی انجام گرفت. افراد تحت مطالعه شامل ۷۹ بیمار بستری در بخش عفونتهای ریوی، ۱۲۱ نفر از کارکنان دارای مواجهۀ شغلی با عامل بیماری و نیز ۱۰۰ نفر از افراد سالم (اهدا کنندگان خون) بودند.

یافته ها: باوجود نادر بودن بیماری نوکاردیوز، ۴ نمونه (IFA) مثبت از بین افرادی که دارای بیماری زمینه ای بودند بدست آمد. این افراد بترتیب مبتلا به سل ریوی، ضایعه جلدی مایستوما، آبسه های متعدد و منتشره در ریه و کبد، و بیماری مزمن انسدادی ریه (COPD) بودند.

نتیجه گیری: یافته های این مطالعه نشان می دهد که احتمال ایجاد عفونت ریوی ثانویه در افراد در معرض خطر (ضعف سیستم ایمنی و دفاع آسیب دیده ریه ها، ضعف دفاع ایمنی سلّولی، بیماری های زمینه ای و پیوند عضو) وجود دارد. از طرفی تماس افرادی که هیچ گونه بیماری زمینه ای یا ضعف سیستم ایمنی نداشتند (پرستاران، بهیاران، کارگران و رفتگران مورد مطالعه که گروه سالم در معرض خطر محسوب میشوند) با مکانهای آلوده به نوکاردیا، باعث ابتلای آنها به نوکاردیوزیس نشان نداد. از نتایج دیگر بدست آمده این بود که هیچ مورد مثبتی در گروه ۳٤ نفره از افراد مورد مطالعه با سابقه مصرف داروهای ایمونوساپرسیو دیده نشد. در نهایت بدلیل کم بودن موارد IFA مثبت، بین سنّ، جنس، شغل، ابتلای به بیماریهای ریوی و حضور آنتی بادی علیه نوکاردیا ارتباط معنی داری بدست نیآمد.

کلید واژه ها: نوکاردیا استروئیدس، ضعف سیستم ایمنی، آزمون ایمنوفلوئرسانس غیر مستقیم (IFA)، بیماری مزمن انسدادی ریه (COPD)

مقدمه:

به نظر می رسد در سال های اخیر بسیاری از بیماری های عفونی مانند سل، ایدز، اعتیاد به مواد مخدر تزریقی، هپاتیت، بیماری های ایمنوساپرسیو، انواع سرطانها، مصرف مداوم کورتیکوستروئیدها شیوع بیشتری پیدا کرده است (۵-۱). اگر چه نوکاردیاها بطورگسترده در اکوسیستم آبی خاکی و نیز بقایای آلی گیاهان پراکنده اند، لیکن هیچگاه به صورت کومنسال در بدن انسان و یا حیوانات یافت نشده اند (۸-۶). علیرغم گزارشاتی که در مورد آلودگی در حیوانات از جمله سگ و گربه و خوکچه هندی وجود دارد، هیچ شاهدی دال به انتقال تنفسی از حیوانات به انسان در دسترس نیست و انتقال ازشخص مبتلا به شخص سالم نیز به اثبات نرسیده است (۱۰-۹). گزارش های منتشر شده در دنیا از وجود بیماران مبتلا به نوکاردیوز مهاجم در بخش های پیوند عضو و انکولوژی (Oncology) خبر می دهد که تصوّر می شود ناشی از استنشاق گرد و غبار آلوده بوده است (۱۷-۱۱). این باکتری اولین بار در سال ۱۸۸۸ توسط یک دامپزشک فرانسوی بنام ادموند نوکارد از یک اسب مبتلا به مشمشه جدا گردید و در سال۱۸۹۰ اپینجر آنرا به افتخار کاشف اولیه آن "نوکاردیا" نام نهاد (۹،۱۸). این باکتری رشته ای شکل، گرم مثبت، هوازی، نیمه اسید دوست، کاتالاز مثبت و از راسته اکتینومایست می باشد که همراه با جنس های مایکوباکتریوم، کرینه باکتریوم و رودوکوکوس خانواده نوکاردیافرم را تشکیل می دهد. در پپتیدوگلیکان دیواره سلّولی دارای مزو دی آمینو پایملیک اسید (DAP) و قند های آرابینوز و گالاکتوز می باشند (۸،۹ و۲۳- ۱۹). جایگاه اصلی نوکاردیا خاک است ولی در آب، فاضلاب و بقایای آلی گیاهان نیز یافت می شود. گونه های پاتوژن درگرد و خاک منزل، شن و ماسهٔ ساحل، خاک باغچه و استخرهای شنا وجود دارد بیماری نوکاردیوز ریوی اغلب در اثر استنشاق و ورود آئروسل های حامل نوکاردیا استروئیدس به دستگاه تنفسی میزبان مستعد بوجود می آید. این باکتری شایع ترین و خطرناکترین گونهٔ پاتوژن انسانی محسوب می شود و عامل اصلی عفونت در جهاز تنفسی است که معمولاً با ایجاد آبسه های متاستاتیک موجبات سیستمیک شدن بیماری را فراهم می کند (۵و۱۱ و۲۵ -۲۱). ضعف سیستم ایمنی و دفاع آسیب دیدهٔ ریه ها که در طیف وسیعی از افراد آسیب پذیر دیده می شود، خطر ابتلاء به نوکاردیوز ریوی را افزایش می دهد (۱۴-۱۱ و۲-۵). نوکاردیا برازیلینسس و نوکاردیا کاویه نیز از گونه های دیگر دخیل در ایجاد عفونت های انسانی می باشند ولی نیاز به ضعف سیستم ایمنی میزبان نداشته و عفونت اولیه ایجاد می نمایند(۲۷-۲۶).

تشخیص بیماری بر مبنای یافتن میکروارگانیسم در نمونه بدست آمده از ضایعات ناشی از بیماری استوار است. نظر به اینکه رشد کامل باکتری حدود ۱ تا ٤ هفته طول می کشد و در برخی موارد برای بدست آوردن نمونه مناسب روشهای تهاجمی نظیر برونکوسکوپی مورد نیاز است (۳۱-۲۸)، لذا امروزه برای پی بردن به آلودگی نوکاردیایی علاوه بر استفاده از روشهای سرولوژی و بررسی آنتی بادی، از تکنیک های پیشرفته مولکولی نیز استفاده می گردد که از این طریق انجام نمونه گیری و تشخیص سریعتر امکان پذیر بوده و قبل از پیشرفت بیماری، جلوی عوارض غیر قابل برگشت و در نهایت مرگ و میر آنها گرفته می شود (۳۴-۳۲ و۲۲).

مواد و روش ها:

این مطالعه از نوع توصیفی بوده و به روش مقطعی (*Cross–Sectional*)با هدف کلی تعیین میزان شیوع آلودگی به نوکاردیا در بیماران ایمنوساپرسیو و کارکنان در معرض خطر بیمارستان امام خمینی(ره) انجام گرفته است. زمان پژوهش از مهرماه ۱۳۷۷ لغایت اردیبهشت ماه ۱۳۷۸ و مکان آن بیمارستان امام خمینی(ره)، سازمان انتقال خون و آزمایشگاه دانشکده بهداشت دانشگاه علوم پزشکی تهران بود. پرسشنامه به روش گردآوری اطلاعات از جامعه مورد پژوهش طراحی شده بود. پس از تکمیل پرسشنامه، نمونه گیری با گرفتن ۵ میلی لیتر خون جهت انجام آزمون، شروع و پس از انتقال به دانشکده بهداشت، سرم از نمونه جدا و هر یک در ۲ ویال جداگانه تا زمان انجام آزمون در حرارت منهای ۲۰ درجه سانتیگراد نگهداری شد. در این تحقیق از روش ایمونوفلوئورسانس غیر مستقیم [1](IFA) که یک روش ساده، ارزان و حسّاس سرولوژی بوده و قابل اجراء در اکثر آزمایشگاههاست، استفاده گردید.

الف- جامعه تحت پوشش، علل انتخاب و تعداد افراد مورد مطالعه:

۱- گروه بیماران بستری شده در بخش های عفونی، ریه، مراقبت های ویژه (ICU) و پیوند اعضاء (۷۹نفر). لازم به ذکر است با توجه به نتایج مطالعه مشابه در بیماران بستری شده در بیمارستان دکتر شریعتی تهران که میزان شیوع آلودگی حدود ۴۰ درصد حاصل شده، با در نظر گرفتن خطای نوع اول (۰/۰۵= à) و میزان خطایی برابر با ۰۱ /۰، عدد ۹۲ بدست آمد که تعداد ۱۰۰ بیمار بستری در نظر گرفته شد ولی ۲۱ بیمار بدلایل مختلف از محاسبه حذف گردیدند.

[1]IFA = Indirect immunofluorescence assay.

۲- گروه کارکنان بیمارستان بدون هیچگونه بیماری زمینه ولی دارای مواجهه شغلی (۱۲۱نفر). برای این گروه تمامی پرسنل که شرایط ورود به مطالعه را داشتند در نظر گرفته شد.

۳- افراد سالم که جهت اهداء خون به سازمان انتقال خون مراجعه کرده بودند (۱۰۰ نفر). با توجه به اینکه میزان مورد انتظار آلودگی به نوکاردیا در افراد سالم جامعه نزدیک به صفر است، برای توصیف اولیه وضعیت آلودگی در جامعه، ۱۰۰ نمونه خون بصورت تصادفی از اهداء کنندگان گرفته شد.

ب- مواد و وسایل مورد نیاز:

بافر مونته از (BBL) ، مواد، معرفها، رنگها و محاولهای شیمیایی مانند ایوانس بلو، بافر (PBS)، سدیم آزاید از کمپانی های Merck SIGMA (&) ، کونژوگه (FITC) آنتی ایمنوگلوبولین انسانی کامل از (DAKO)، و سرم گاوی (Fetal Calf Serum) از کمپانی (Seromed). سایر مواد مانند ظروف شیشه ای، لام فلورسانس و غیره از شرکتهای داخلی تهیه گردید. دستگاه اسپکتروفتومتر (طول موج مناسب ۵۸۰ نانومتر و بهترین دانسیته میکروبی برای تهیه آنتی ژن حدود ۰/۰۳۲تعیین گردید)، میکروسکوپ فلورسانس مدل CETI، روتاتور و سایر دستگاها از آزمایشگاههای مجهز دانشکده بهداشت استفاده گردید.

ج- روش کار:

مراحل آزمون ایمونوفلوئورسانس غیر مستقیم:

۱- در ابتدا از سرم بیمار با PBS رقت های مختلف تهیه و آنها را به دمای اطاق رساندیم

۲- در هر لام سه چاهک بترتیب به کنترل مثبت، منفی و بافر PBS با $pH = 7.2$ اختصاص داده شد.

۳- حجم۱۰ میکرولیتر از سرم رقیق شده به ترتیب به چاهک های حاوی آنتی ژن اضافه شد. (سرم کنترل مثبت از یک بیمار نوکاردیوز ریوی که بیماری آن توسط کشت ثابت شده بود گرفته شد) برای سرم کنترل مثبت و منفی از رقت ۱/۸ سرم استفاده گردید.

٤- قرار دادن لام در اطاقک مرطوب به مدت نیم ساعت در حرارت ۳۷ درجه سانتی‌گراد.

۵- شستشوی لام: ابتدا لام را پس از خارج کردن از اطاقک مرطوب با چند قطره PBS به آرامی شسته و آن را در داخل جا لامی حاوی PBS به مدت ۱۰ دقیقه بر روی روتاتوری که سرعت آن ۵۰ دور در دقیقه بود قرار دادیم. پس از طی این مدت، لام را خارج کرده و دوباره با چند قطره PBS به آرامی شسته و با پوآر خشک نمودیم

٦- به هریک از حفره‌ها ۱۰ میکرولیتر کونژوگه رقیق شده با PBS که حاوی (۱٪) FCS و چند قطره محلول رنگی ایوانس بلو است، اضافه نموده و سپس به مدت۳۰ دقیقه در اطاقک مرطوب در دمای $37\ ^{\circ}C$ قرار دادیم.

۷- انجام مراحل شستشو و خشک کردن مانند مرحلهٔ ۵

۸- با افزودن بافرمونته بر روی لام و قراردادن لامل، این مجموعه آمادهٔ مطالعه زیر میکروسکوپ IFA گردید.

برای کنترل صحت آزمون، از سرم هایی که واکنش مثبت نشان می‌دادند، رقت های بالاتر تهیه و آزمایش برروی آنها تکرار گردید. اگر چه کجلستروم در سال ۱۹۹۳ با استفاده از تست های سرولوژی (Western Blot, IFA, ELISA) نشان داد که این تست ها برای نوکاردیوز کاملاً اختصاصی است. معذالک برای حذف واکنش های غیر اختصاصی مطالعه اثر واکنش متقاطع (Cross Reaction) سرم بیمار را با سوسپانسیون استرپتومایسز و اکتینومایسز واکنش جذب (Absorption) انجام گرفت که تفاوتی در تیتر مشاهده نگردید.

یافته ها:

افراد تحت مطالعه عبارت بودند از ۱۰۰ نفر (۳۳/۳٪) اهداء کننده خون، ۱۲۱ نفر (٤۰/۳٪) از کارکنان سالم دارای مواجهه شغلی، شامل پرستاران، بهیاران، کارگران و رفتگران و ۷۹ نفر (۲۶/۳٪) از بیماران بستری شده در بخش های عفونی، ریه، مراقبتهای ویژه (ICU) و پیوند اعضاء . جدول شماره ۱ ویژگیهای جمعیّت مورد مطالعه را به تفکیک موارد آنتی بادی مثبت، گروههای سنی، پراکندگی جنس و شغل نشان می دهد.

در جدول شماره ۲ توزیع فراوانی مطلق و نسبی جمعیّت مورد مطالعه براساس نتیجه آزمایش ایمنوفلورسانس غیر مستقیم علیه نوکاردیا گنجانده شده است. در این مطالعه علیرغم نادر بودن بیماری، ٤ نمونه مثبت بدست آمد که از بین آنها یک نفر مبتلا به سل ریوی، یک نفر مبتلا به ضایعه جلدی مایستوما، یک بیمار مبتلا به آبسه منتشره در ریه و کبد و یک نفر نیز به بیماری مزمن انسدادی ریه طولانی مدت[2] (**COPD**) مبتلا شده بود. نتایج اندازه گیری عیار آنتی بادی در ٤ بیمار سرولوژی مثبت نوکاردیا در جدول شماره ۳ درج گردیده است ضمن اینکه پراکندگی نوع بیماری زمینه ای در بیماران بستری شده در نمودار شماره ۱ نشان

[2] **COPD = Chronic obstructive pulmonary disease**

داده شده است.. لازم به ذکر است با وجود سابقه مصرف داروهای ایمونوساپرسیو در ۳٤ نفر از افراد مورد مطالعه، مورد مثبتی دیده نشد.

جدول۱: توزیع فراوانی مطلق و نسبی سرولوژی مثبت در جمعیّت مورد مطالعه براساس جنس،گروههای سنّی و شغل

جنس		مرد		زن		کل	
مشخّصات افراد		مثبت (درصد)	جمع (درصد)	مثبت (درصد)	جمع (درصد)	مثبت (درصد)	جمع (درصد)
گروههای سنّی(سال)	۱۰-۳۰	۰ (۰)	۳۰ (۱۰۰)	۰ (۰)	۱۵ (۱۰۰)	۰ (۰)	٤۵ (۱۰۰)
	۳۰-۵۰	۲ (۱/۹)	۱۰۳ (۱۰۰)	۰ (۰)	٦۰ (۱۰۰)	۲ (۱/۲)	۱٦۳ (۱۰۰)
	۵۰ -۷۰	۱ (۱/۹)	۵۲ (۱۰۰)	۰ (۰)	۳۲ (۱۰۰)	۱ (۱/۱)	۸٤ (۱۰۰)
	۷۰-۹۰	۰ (۰)	۷ (۱۰۰)	۱ (۱۰۰)	۱ (۱۰۰)	۱ (۱۲/۵)	۸ (۱۰۰)
شغل	محصّل	۰ (۰)	۵ (۱۰۰)	۰ (۰)	۱ (۱۰۰)	۰ (۰)	٦ (۱۰۰)
	پرستار و بهیار	۰ (۰)	۱۱ (۱۰۰)	۰ (۰)	۲۵ (۱۰۰)	۰ (۰)	۳٦ (۱۰۰)
	کارگر	۲ (٦/٦)	۳۰ (۱۰۰)	۰ (۰)	۱۵ (۱۰۰)	۲ (٤/٤)	٤۵ (۱۰۰)
	رفتگر	۱ (۲/۵)	٤۰ (۱۰۰)	۰ (۰)	۰ (۰)	۱ (۲/۵)	٤۰ (۱۰۰)
	سایر مشاغل	۰ (۰)	۱۰٦ (۱۰۰)	۱ (۱/٤)	٦۷ (۱۰۰)	۱ (۰/۵)	۱۷۳ (۱۰۰)
جمع کل		**۳ (۱/۵)**	**۱۹۲ (۱۰۰)**	**۱ (۰/۹)**	**۱۰۸ (۱۰۰)**	**٤ (۱/۳)**	**۳۰۰ (۱۰۰)**

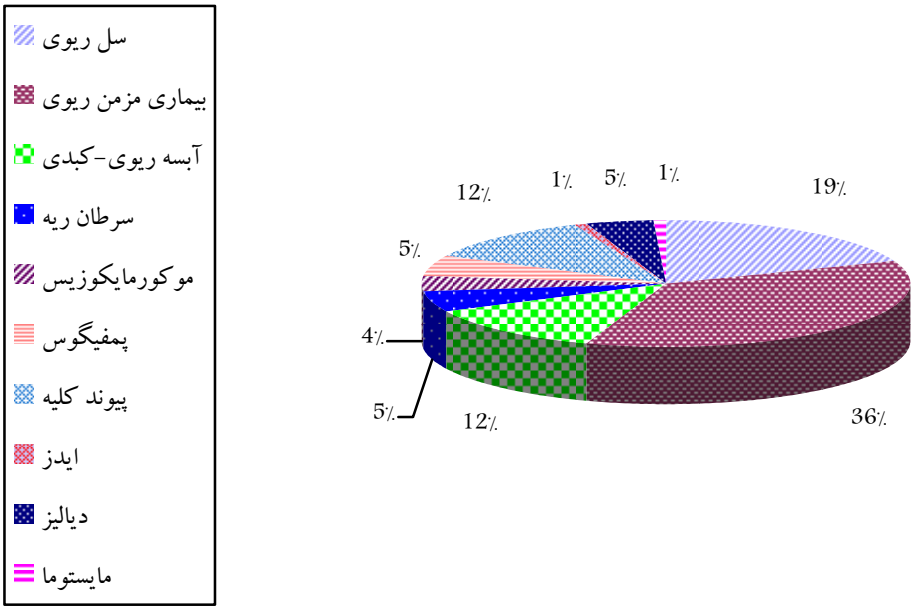
جدول ۲: توزیع فراوانی مطلق و نسبی جمعیّت مورد مطالعه براساس نتیجه آزمایش ایمنوفلورسانس غیر مستقیم علیه نوکاردیا

جمعیت تحت مطالعه	مثبت	در صد	منفی	در صد	جمع
گروه سالم بدون مواجههء شغلی	۰	۰	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰
گروه سالم دارای مواجههء شغلی	۰	۰	۱۲۱	۱۰۰	۱۲۱
بیماران بستری تحت مطالعه	۴	۵	۷۵	۹۵	۷۹
جمع	**۴**	**۱/۳**	**۲۹۶**	**۹۸/۷**	**۳۰۰**

جدول ۳: نتایج عیار آنتی بادی در ٤ بیمار سرولوژی مثبت نوکاردیا

نوع بیماری	سنّ	جنس	شغل	سرم رقیق نشده کامل	رقت سرم رقیق شده				
					½	¼	⅛	1/16	1/32
مایستوما	۳۹	مرد	کارگر	++++	+++	+++	++	+	–
عفونت مزمن ریوی	۵۷	مرد	کارگر	++++	+++	+++	++	+	–
آبسه منتشره	۷۱	زن	خانه دار	+++	+++	++	++	+	–
سل ریوی	٤۲	مرد	رفتگر	++	+	–	–	–	–

نمودار شماره۱: پراکندگی نوع بیماری زمینه ای در بیماران بستری مورد مطالعه



بحث:

سرکوب سیستم ایمنی خصوصاً عملکرد ناهنجار ایمنی سلّولی، زمینه را برای تهاجم نوکاردیا استروئیدس کمپلکس (استروئیدس، نووا و فارسینیکا) به ریه ها فراهم می کند (۳۹-۳۵). این فرایند اغلب در گیرندگان عضو مانند پیوند کلیه، کبد، قلب و مغز استخوان دیده می شود (۱۳-۱۰). آمفیزم ریوی، برونشکتازی، عفونتهای مزمن ریوی، امپیم، مصرف مداوم کورتیکوستروئیدها، ایدز، انواع سرطانها و بطور کلّی تمام کسانی که به هر دلیل سیستم دفاع سلّولی آنها تضعیف شده باشد، در معرض ابتلاء به نوکاردیوز ریوی می باشند(۷-۱). در حالیکه ابتلاء به نوکاردیوز غیر ریوی که با تهاجم نوکاردیا برازیلینسس، نوکاردیا کاویه و غیره ممکنست رخ دهد، نیاز به ضعف سیستم ایمنی میزبان نداشته و عفونت اولیه ایجاد می نمایند (۲۷-۲۶).

پیوند مغز استخوان یکی از عوامل خطرساز (Risk factors) و مهم بوده و متوسط زمان لازم برای موفقیّت پس از دریافت پیوند، ۲۱۰ روز تخمین زده شده است که این زمان برای رشد نوکاردیا کافی است (۱۶، ۱۲). از طرفی انسیدانس بیماری نوکاردیوز بین گیرندگان پیوند کلیه بین صفر تا۲۰ در صد برآورده شده است (۴۲،۳۹،۱۱) و ابتلا به این بیماری عامل مهم در افزایش میزان ناتوانی و مرگ و میر در این گروه از بیماران به شمار می آید. از آنجا که علائم بالینی و رادیولوژیک مبتلایان به نوکاردیوز ریوی مشابه سل ریوی میباشد، بررسی نوکاردیا بخصوص در بیماران HIV مثبت که با علائم ریوی مراجعه می کنند و یافته مثبتی به نفع سل ریوی (TB) ندارند، امری ضروری به نظر می رسد (۳-۲).

با بررسی بانک های علمی و اطلاعاتی، مقالات متعددی در سراسر دنیا درباره نوکاردیا به چاپ رسیده که این باکتری را به عنوان عامل اصلی نوکاردیوز ریوی معرفی کرده اند (۱۳-۱۰). لوپز و همکارانش درتحقیقات خود عنوان می دارند که اگرچه نوکاردیا در خاک به صورت ساپروفیت زندگی می کند، اما در انسان و حیوانات به شکل کومنسال یافت نمی شود، ضمن اینکه عفونت های نوکاردیایی اغلب در ریه جایگزین شده و بین عفونت نوکاردیایی و بعضی بیماری های زمینه ای یک رابطه مستحکم وجود دارد (۶). با این وجود این محققین معتقدند حداقل ۱۵ درصد بیماران مبتلا به نوکاردیوز ریوی هیچ بیماری زمینه ای ندارند (۴۱-۴۰). در ایران نیز پژوهشهای متعدّدی انجام شده که بعضی از آنها به گزارشهای موردی پرداخته است (۴۲ و۳۲ و۲۲)، دراغلب مطالعات انجام شده تاکید به این نکته شده است که تشخیص بالینی بیماری نوکاردیوز در مراحل اولیه به آسانی میسّر نبوده و نیاز به انجام آزمایشات پاراکلینیکی دارد (۵-۱و ۱۲-۱۱)، بنابراین بایستی در هر بیمار با ضایعه یا عفونت ریوی که بدنبال عفونت ها و بیماریهای زمینه ای بوجود می آید، به حضور نوکاردیا در عفونت توجه کرد و انجام آزمایشات پاراکلینیکی را جهت تشخیص قطعی مدّ نظر قرار داد.

روش کشت بعنوان یک روش پایه و نیز استاندارد طلائی سالهاست که در آزمایشگاهها کاربرد دارد، امّا در مورد باکتری های کند رشد مانند نوکاردیا، روش مناسبی برای تشخیص سریع نیست. تهیه لام مستقیم از نمونه خلط بیمار نوکاردیائی نیز بدلیل مخلوط شدن با ترشحات دهان از دقت لازم برخوردار نمی باشد. لذا تهیه نمونه های بیوپسی و لاواژ به تشخیص کمک می نماید (۴۴-۴۳ و۳۱-۲۸). با وجود این، بعلّت پائین بودن سرعت و حسّاسیت تشخیص، نیاز به استفاده از روشهای سریع و مطمئن تری احساس می شود. روشها و تست های سرولوژیک (IFA, ELISA, Western-blot, Enzyme Immunoassay) که کاربرد زیادی در تشخیص نوکاردیوز دارد، قادر است بسیاری از نقاط ضعف روش کشت را جبران نماید (۳۴-۳۲ و۲۲). نظر به اینکه امروزه تکنیکهای مولکولی پیشرفته ای نظیر PCR 16S rDNA, DNA Probing, PCR Assay, PCR RFLP, PCR fingerprinting کاربرد بسیاری پیدا نموده (۲۵و۴۷-۴۴) لذا با برخورداری مراکز علمی، تحقیقاتی و دانشگاهی از دستگاههای پیشرفته، بتدریج امکان تشخیص قطعی باکتری فراهم می گردد. اگر چه هنوز از نظر اقتصادی امکان بهره برداری از تکنیکهای پیشرفته مولکولی برای تشخیص باکتری در آزمایشگاه های تشخیص طبی و مراکز درمانی فراهم نشده است، لیکن جای امیدواری است که با بودجه های تخصیصی مربوط به بخش تحقیقات بخصوص در دانشگاههای کشور این مهم هرچه سریعتر محقّق شود.

مطالعه حاضر بر روی یک جمعیت ۳۰۰ نفری در مجتمع بیمارستانی امام خمینی(ره) تهران و بروش مقطعی انجام گرفت. افراد تحت مطالعه شامل ۷۹ بیمار بستری در بخش عفونت های ریوی، ۱۲۱ نفر از کارکنان دارای مواجههٔ شغلی با عامل بیماری و نیز ۱۰۰ نفر از افراد سالم (اهدا کنندگان خون) بودند. بیماران بستری شده مورد مطالعه عمدتاً مبتلا به بیماریهایی بودند که به علّت پاتوژنز خاّص آن بیماری و یا نیاز به مصرف داروهای

سرکوب کننده سیستم ایمنی، زمینه جهت آلـودگی بـه نوکاردیـا در آنها فراهـم شده بود. با توجه به نتایج بدست آمده، در هیچ یک از اهداء کنندگان خون که به سازمان انتقال خون مراجعه کرده بودند و ۳۳/۳ درصد از کل جمعیـت مـورد مطالعـه را تـشکیل مـی دادنـد، آزمون IFA مثبت نگردید. این نتیجه بیـانگر ایـن نکتـه اسـت کـه بدون زمینه خاّص و ضعف سیستم ایمنی، آلودگی به نوکاردیا دیده نمی شود. از طرفی در هیچ یک از افراد سالم دارای مواجههء شغلی که حدود ٤٠ در صد کّل جمعیت مورد مطالعه را تشکیل می دادند نیز آنتی بادی علیه نوکاردیا یافت نشد و این تاکیدی بر این مطلـب است که داشتن بیماری زمینه ای، فاکتور اصلی آلودگی به نوکاردیـا است. نداشتن آزمون مثبت IFA حتی در رقّتهای کم در کـارگران و رفتگران مورد بررسی، نشان می دهد که تماس با مکانهـای حـاوی میکروارگانیـسم در صـورت نبـودن بیمـاری زمینـه ای، نقـشی در بیماریزایی ندارد. علی رغم نتـایج بدسـت آمـده در دنیـا مبنـی بـر استعداد زیاد مصرف کنندگان داروهای ایمونوساپرسیو به عنوان یکی از میزبانان بیماری نوکاردیوز، در ٣٤ نفر از افراد بستری مـورد مطالعه که سابقه مصرف داروهای ایمونوساپرسیو داشتند، هیچ مورد مثبتی دیده نشد. بعبارت دیگـر مـوارد مثبـت آزمـون IFA، ارتبـاط معنی داری را با مصرف داروهای ایمونوساپرسـیو نـشان نـداد، امـا یافتن نمونه های مثبت بخصوص در افراد با بیماری های زمینه ای، مؤیّد این نظریه است که اولاً ابتلاء به نوکاردیوز در ایران امـر غیـر شایعی نیست و ثانیاً این یافته نفی کننده وجود آنتـی بـادی در ایـن گروه نمی باشد. در این رابطه بنظر میرسد نیاز بـه مطالعـه بـر روی تعداد بیشتری از بیماران ایمنوساپرسیو باشد. در این مطالعه علیرغم نادر بودن بیماری، ٤ نمونه مثبت بدست آمد که از بین آنها یک نفر به سل ریوی، یک نفر به ضایعه جلدی مایستوما، یک نفر بـه آبـسه منتشره ریه و کبد و یک نفر نیـز بـه بیمـاری مـزمن انـسدادی ریـه طولانی مدت مبتلا بودند.

نتیجه گیری:

یافته های این مطالعه نشان می دهد که احتمال ایجاد عفونت ریوی ثانویه در افراد در معرض خطر (ضعف سیستم ایمنی و دفاع آسیب دیده ریه ها، ضعف دفاع ایمنی سلّولی، بیمـاری هـای زمینـه ای و پیوند عضو) وجود دارد. از طرفـی تمـاس افـرادی کـه هـیچ گونـه بیماری زمینه ای یا ضعف سیستم ایمنی نداشتند (پرستاران، بهیاران، کارگران و رفتگران مورد مطالعه که گـروه سـالم در معـرض خطـر محسوب میشوند) با مکانهای آلوده به نوکاردیا، باعث ابـتلای آنهـا به نوکاردیوزیس نشان نداد. از نتایج دیگر بدست آمده این بـود کـه هیچ مورد مثبتی در گروه ٣٤ نفره از افراد مـورد مطالعـه بـا سـابقه مصرف داروهای ایمونوساپرسیو دیده نـشد. در نهایـت بـدلیل کـم بودن موارد IFA مثبت، بین سنّ، جنس، شغل، ابتلای به بیماریهای ریوی و حضور آنتی بادی علیه نوکاردیا ارتباط معنی داری بدسـت نیآمد.

فهرست مراجع:

1. Huang HC, Yu WL, Shieh CC, Cheng KC, Cheng HH. Unusual mixed infection of thoracic empyema caused by *Mycobacteria tuberculosis*, nontuberculosis *mycobacteria* and *Nocardia asteroides* in a woman with systemic lupus erythematosus. *J Infect*. 2007; **54**: 25-28.
2. Jinno S, Jirakulaporn T, Bankowski MJ, Kim W, Wong R.A Rare Case of *Nocardia asteroides* Pericarditis In An HIV-Infected Patient. *J Clin Microbiol*. 2007; **16**: (Epub ahead of print).
3. Soto-Hernandez JL, Moreno-Andrade T, Gongora-Rivera F, Ramirez-Crescencio MA. *Nocardia* abscess during treatment of brain toxoplasmosis in a patient with AIDS, utility of proton MR spectroscopy and diffusion-weighted imaging in diagnosis. *Clin Neurol Neurosurg*. 2006; **108**: 493-498.
4. Chow E, Moore T, Deville J, Nielsen K. *Nocardia asteroides* brain abscesses and meningitis in an immunocompromized 10-year-old child. *Scand J Infect Dis*. 2005; **37**: 511-513.
5. Baldi BG, Santana AN, Takagaki TY. Pulmonary and cutaneous nocardiosis in a patient treated with corticosteroids. *J Bras Pneumol*. 2006; **32**: 592-595.
6. Lopez, E, Ferrero M, Lumbreras C, Gimeno C, González-Pinto I, Palengue E. "A case of testicular nocardiosis and literature review". *Euro J Clin Microbiology infect Dis.* 1994; **13:** 310 -313.
7. Agterof MJ, van der Bruggen T, Tersmette M, Ter Borg EJ, van den Bosch JM, Biesma DH.

Nocardiosis: a case series and a mini review of clinical and microbiological features. *Neth J Med*. 2007; **65**: 199-202.
8. Conville PS, Witebsky FG. *Nocardia* and other aerobic Actinomycetes. In: Topley & Wilson's. SP Borriello, PR Murray, G Funke eds: A Text book of Microbiology, Vol.2 Bacteriology, 10th ed. Hodder Arnold. 2005; pp: 1153-1166.
9. Forbes BA, Sahm DF, Weissfeld AS. *Nocardia, Streptomyces, Rhodococcus,* and Similar Organisms. In: Bailey & Scott's. Diagnostic Microbiology: A Text book of Microbiology. 12th ed. MOSBY, Elsevier. 2007; pp: 311-322.
10. Wingard JR. The changing face of invasive fungal infections in hematopoietic cell transplant recipients. *Curr Opin Oncol*. 2005; **17**: 89-92. Review.
11. Ozturk S, Tufan F, Alisir S, Gorcin S, Guven D, Cagatay A, Turkmen A. A case of isolated *Nocardia asteroides* brain abscess in a kidney transplant recipient. *Transplant Proc*. 2006; **38**: 3121-3124.
12. Laurence AD, Peggs KS. Cerebral and pulmonary *Nocardia* in a bone marrow transplant patient. *Br J Haematol*. 2005; **129**: 711.
13. Oszoyoglu AA, Kirsch J, Mohammed TL. Pulmonary nocardiosis after lung transplantation: CT findings in 7 patients and review of the literature. *J Thorac Imaging*. 2007; **22**: 143-148.
14. Apostolakis S, Chalkiadakis I, Ventouri M, Maraki S, Tsoussis S. Lymphocutaneous nocardiosis in a lymphopenic breast cancer patient under treatment with docetaxel. *Breast J*. 2005; **11**: 469-472.
15. Yamada SM, Nakai E, Toyonaga S, Nakabayashi H, Park KC, Shimizu K. A rapidly enlarging Nocardial brain abscess mimicking malignant glioma. *J Nippon Med Sch*. 2005; **72**: 308-311.
16. Lin JT, Lee MY, Hsiao LT, Yang MH, Chao TC, Chen PM, Chiou TJ.Pulmonary nocardiosis in a patient with CML relapse undergoing imatinib therapy after bone marrow transplantation. *Ann Hematol*. 2004; **83**: 444-446.
17. Whyte M, Irving H, O'Regan P, Nissen M, Siebert D, Labrom R.Disseminated Scedosporium prolificans infection and survival of a child with acute lymphoblastic leukemia.*Pediatr Infect Dis J*. 2005; **24**: 375-377.
18. Sorrel TC, Mitchell DH, Iredell JR. Nocardiosis. In: GL Mandell, RG Douglas and JE Bennett, eds. Principles and practice of infectious diseases: A Text book of infectious Diseases 6th ed. Churchill Livingstone.2005; Vol 2. pp: 2916-2924.
19. Filice GA. Nocardiosis. In: Harison's. DL Kasper, E Braunwald, AS Fauci, SL Hauser, DL Longo, JL Jameson eds. Principles of Internal Medicine: A Text book of infectious Diseases. 16th ed. McGraw-Hill. 2005; pp: 934-937.
20. Kilincer C, Hamamcioglu MK, Simsek O, Hicdonmez T, Aydoslu B, Tansel O and *et al*. Nocardial brain abscess: review of clinical management. *J Clin Neurosci*. 2006; **13**: 481-485.
21. Ramulu HG, Adindla S, Guruprasad L.Analysis and modeling of mycolyl-transferases in the CMN group. *Bioinformation*. 2006; **18**:161-169.
22. Eshraghi S, Amin M. Pulmonary Nocardiosis associated with Cushing's Syndrome, *Pak J Med Sci*. 2004; **20**: 18-23.
23. O'Neill E, Fitzpatrick F, Smyth E. Nocardial brain abscess: an unusual cause of acute confusion. *Ir Med J*. 2005; **98**: 116.
24. Menku A, Kurtsoy A, Tucer B, Yildiz O, Akdemir H. Nocardial brain abscess mimicking brain tumour in immunocompetent patients: report of two cases and review of the literature. *Acta Neurochir* (Wien). 2004; **146**: 411-414.
25. Yamamura H, Hayakawa M, Nakagawa Y, Iimura Y. Characterization of *Nocardia asteroides* isolates from different ecological habitats on the basis of repetitive extragenic palindromic-PCR fingerprinting. *Appl Environ Microbiol*. 2004; **70**: 3149-3151.
26. Ahmed AA, van de Sande WW, Fahal A, Bakker-Woudenberg I, Verbrugh H, van Belkum A. Management of mycetoma: major challenge in tropical mycoses with limited international recognition. *Curr Opin Infect Dis*. 2007; **20**: 146-151. Review
27. George SJ, Rivera AM, Hsu S. Disseminated cutaneous nocardiosis mimicking cellulitis and erythema nodosum. *Dermatol Online J*. 2006; **12**: 13.
28. Shaikh MA, Byrd RP Jr, Roy TM. Pulmonary nocardiosis: an unusual cause of a solitary pulmonary nodule. *J Ky Med Assoc*. 2006; **104**: 184-189.
29. Kumar N, Ayinla R. Endobronchial pulmonary nocardiosis. *Mt Sinai J Med*. 2006; **73**: 617-619.

30. Gowrinath K, Das S, Ranjitham M, Sekhar U, Thanasekaraan V. Nocardial hydropneumothorax. *Indian J Chest Dis Allied Sci*. 2004; **46**: 51-53.
31. Kawkitinarong K, Sittipunt C, Wongtim S, Udompanich V. Pulmonary alveolar proteinosis: a report of seven patients from King Chulalongkorn Memorial Hospital. *J Med Assoc Thai*. 2005; **88**: 312-316.
32. Eshraghi S, Sarrafnejad AF, Taheri Roudsary H. A diagnostic study of Nocardiosis patients being confined in Shareati Training Hospital in Tehran, using cultural and serological methods. *Pak J Med Sci*, 2005; **21**: 345-351.
33. Salinas-Carmona MC, Perez-Rivera I.Humoral immunity through immunoglobulin M protects mice from an experimental actinomycetoma infection by *Nocardia brasiliensis*. *Infect Immun*. 2004; **72**: 5597-5604.
34. Ellis TN, Beaman BL.Murine polymorphonuclear neutrophils produce interferon-gamma in response to pulmonary infection with *Nocardia asteroides. J Leukoc Biol*. 2002; **72**: 373-381.
35. Ambaye A, Kohner PC, Wollan PC, Roberts KL, Roberts GD, Cockerill FR. Comparison of agar dilution, broth microdilution, disk diffusion, E-test, and BACTEC radiometric methods for antimicrobial susceptibility testing of clinical isolates of the *Nocardia asteroides* complex. *J Clin Microbiol*. 1997; **35**: 847-852.
36. Brown JM, Cowley KD, Manninen KI, McNeil MM. Phenotypic and molecular epidemiologic evaluation of a *Nocardia farcinica* mastitis epizootic. *Vet Microbiol*. 2007; **6** (Epub ahead of print).
37. Cremades MJ., Menendez R, Santos M, Gobernado M. Repeated pulmonary infection by *Nocardia asteroides* complex in a patient with bronchiectasis. *Respiration*. 1998; **65**: 211-213.
38. Liff DA, Kraft C, Pohlel K, Wade J, Franco-Paredes C, Chen EP, Clements S Jr, Sperling L. *Nocardia nova* aortitis after coronary artery bypass surgery. *J Am Soc Echocardiogr*. 2007; **20**: 537.e7-8.
39. Sharma M, Gilbert BC, Benz RL, Santoro J. Disseminated *Nocardia otitidiscaviarum* infection in a woman with sickle cell anemia and end-stage renal disease. *Am J Med Sci*. 2007; **333**: 372-375.
40. Perez-Camarero E, Marti J, Idigoras I, Anton E. Pulmonary nocardiosis in non-immunocompromised patient. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 1999; **17**: 476-478.
41. Brechot JM, Capron F, Prudent J, Rochemaure J. Unexpected pulmonary nocardiosis in a non-immunocompromised patient. *Thorax*. 1987; **42**: 479-480.
42. Pourmand G, Jazaeri SA, Mehrsai A, Kalhori S, Afshar K Nocardiosis: report of four cases in renal transplant recipients. Renal Transplantation Unit, Sina Hospital, Tehran University of Medical Sciences, *Iran Transplant Proc.* 1995; **27**: 2731-2733.
43. Gouriet F, Fenollar F, Patrice JY, Drancourt M, Raoult D. Use of shell-vial cell culture assay for isolation of bacteria from clinical specimens: 13 years of experience *J Clin Microbiol.* 2005; **43**: 4993-5002.
44. Wanner TJ, Gerhardt SG, Diette GB, Rosenthal DL, Orens JB. The utility of cytopathology testing in lung transplant recipients. *J Heart Lung Transplant*. 2005; **24**: 870-874.
45. Valenzuela-Tovar JF, Contreras-Perez C, Shibayama-Hernandez H, Chavez-Gonzalez L, Vazquez-Chacon CA, Olivera-Diaz H. Biochemical identification and molecular characterization (PCR-RFLP) of *Nocardia* isolates from sputum. *Arch Med Res*. 2005; **36**: 356-361.
46. Brown JM, Pham KN, McNeil MM, Lasker BA.Rapid identification of *Nocardia farcinica* clinical isolates by a PCR assay targeting a 314-base-pair species-specific DNA fragment. *J Clin Microbiol*. 2004; **42**: 3655-3660.
47. Wada R, Itabashi C, Nakayama Y, Ono Y, Murakami C, Yagihashi S.Chronic granulomatous pleuritis caused by *Nocardia*: PCR based diagnosis by nocardial 16S rDNA in pathological specimens. *J Clin Pathol*. 2003; **56**:966-969.

مجله میکروب شناسی پزشکی ایران

سال ۱ شماره ۱ بهار ۱۳۸۶، صفحات ۱۱ – ۱۶

بررسی شیوع ژنهای آنزیم های تغییر دهنده آمینوگلیکوزیدها در انتروکوکوس فکالیس و انتروکوکوس فسیوم در ایران

محمد مهدی فیض آبادی[*۱]، سارا صیادی[۲]، لیلا شکرزاده[۲]، سپیده خطیبی [۲] ،سارا غروی [۲]

۱) گروه میکروبشناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تهران

۲) گروه زیست شناسی، دانشگاه الزهرا، تهران

نویسنده رابط : محمد مهدی فیض آبادی، گروه میکروبشناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تهران

تلفن : ۸۸۹۵۵۸۱۰ mfeizabadi@tums.ac.ir

تاریخ دریافت مقاله : ۸۶/۳/۱ تاریخ پذیرش مقاله : ۸۶/۳/۲۲

چکیده:

زمینه و اهداف: سویه های مقاوم به غلظت های بالای جنتامایسین در بیمارستان های تهران شایع می باشد. شناخت ژن های مسئول مقاومت در پیش بینی نوع مقاومت احتمالی به سایر آمینو گلیکوزیدها و اتخاذ سیاست های درمانی موثر می باشد.

روش بررسی:در این مطالعه ابتدا سویه های انترو کوکوس مقاوم به غلظت های بالای جنتامیسین با دیسکهای حاوی ۱۲۰ میکروگرمی شناسائی و جدا شدند. ۷۹ سویه انتروکوکوس فکالیس و ۳۵ انتروکوکوس فسیوم دارای این مقاومت بودند. این جدایه ها از سه بیمارستان در تهران در طی دو سال(۱۳۸۴-۱۳۸۳) جمع آوری شدند. حد اقل غلظت کشنده برای جنتامیسین به روش ماکرو براث انجام گردید. تست های حساسیت دارویی به روش کر بی بوئر برای آنتی بیوتیک های آمیکاسین، نتیل مایسین، توبرامایسین و کانامایسین انجام شدند. تمامی جدایه ها برای انجام واکنش زنجیره ای پلیمراز ژنهای تغییر دهنده آمینوگلیکوزیدها (Aminoglycoside modifying Enzymes; MEs) که شامل *aac(6´)-aph(2´)*، *aph(2´)-Ib, aph(2´)-Ic, aph(2´)-Ia, aph(2´)-Id, aph(3´)-IIIa,* و *ant(4´)-Ia* می باشند انتخاب شدند.

یافته ها: ۵۹ جدایه (۵۲٪) فنوتیپ HLGR (High Level Gentamicin Resistant) را نشان دادند. MIC درتمام سویه های HLGR بیش از ۵۰۰ میکروگرم بوده و در سویه های LLGR (Low Level Gentamicin Resistant) مقدار MIC بین ۶۴ تا۵۰۰ میکروگرم در میلی لیتر متغیر بوده است . تمام سویه های HLGR حاوی ژن *aac(6´)-aph(2´´)* بودند. ژن *aph(3´´)-III* در ۶۱٪ از سویه های با فنوتیپ HLGR و در ۶۵٪از سویه های دارای MIC<500 دیده شد. وجود همزمان دو ژن *aac(6´)-aph(2´´)* و *aph(3´)IIIa* در بین سویه های انتروکوکوس فکالیس و انتروکوکوس فسیوم به ترتیب ۶۰٪و ۶۵٪ دیده شدند. ژن *aph(2´)Ic* در دو سویه از انتروکوکوس فسیوم تکثیر شد. نتایج PCR برای ژن های *aph(2´)-Id aph(2´)-Ic ant(4´)-Ia,* منفی بود. ژن *aac(6´)-aph(2´´)* و سپس ژن *aph(3´)-IIIa* بیشترین ژن های موثر در ایجاد مقاومت به جنتامیسین و بقیه آمینوگلیکوزیدها می باشند.

نتیجه گیری: سویه های فاقد این ژنها به تمامی آمینوگلیکوزیدهای تست شده در این مطالعه حساس بودند. به دلیل حضور ژن *aac(6´)-aph(2´´)* اغلب سویه های مقاوم به جنتا مایسین به سایر آمینو گلیکوزیدها مقاوم می باشند.

کلید واژه ها: انتروکوکوس فکالیس ، انتروکوکوس فسیوم ، آمینو گلیکوزیدها

مقدمه:

انتروکوک ها به خصوص انتروکوکوس فکالیس و انتروکوکوس فسیوم دارای مقاومت ذاتی به غلظت های پایین جنتامیسین می باشند، بطوریکه حداقل غلظت مهار کننده رشد (MIC) در این باکتري ها ۴ تا ۶۴ میکروگرم در میلی لیتر می باشد (۱). یکی از دلایل مقاومت به مقادیر پایین این گروه از آنتی بیوتیک ها نفوذ اندک آمینوگلیکوزیدها از خلال غشا سلول می باشد(۲). ترکیب یک آمینوگلیکوزید با یک عامل ضد دیواره مانند بتالاکتام یا ونکومایسین ایجاد اثر سینرژیستی روی سویه های حساس نموده و می تواند در درمان عفونت ها موثر باشد. سویه های مقاوم به غلظت های بالای جنتامایسین (High Level Gentamicin Resistant; HLGR) در کشورهای مختلف دیده شده است (۵-۳). سویه های HLGR (MIC>500µg/ml) توانایی تغییر در ساختار بیوشیمیایی آمینوگلیکوزیدها را توسط آنزیم های تغییر دهنده آمینوگلیکوزیدها (Aminoglycosides Modifying Enzymes: AMEs) را دارا هستند. سویه های تولید کننده AMEs اثر سینرژیستی بین آمینوگلیکوزیدها و عوامل ضد دیواره را از بین می برند(۶). گزارشات بسیاری از AMEs های گوناکون در سراسر دنیا وجود دارند.

ژن *aac(6´)-aph(2´)* که آنزیم دو کاره ۶ آمینوگلیکوزید استیل ترانسفراز و ۲ آمینوگلیکوزید فسفو ترانسفراز را کد می کند در اغلب انتروکوک های مقاوم به آمینوگلیکوزیدها دیده شده است (۷). در سالهای اخیر ژنهای مقاومت بیشتری مانند *aph(2´)-Ia, aaph(2´)-Id, aph(3´)-IIIa, ant(4´)-Ia aph(2´)-Ib, aph(2´)*-Ic که مقاومت به آمینوگلیکوزیدها را کد می کنند در جمعیت های انتروکوکی دیده شده است (۱۱-۸). به علاوه آنزیم هایی که آمینوگلیکوزیدها ی غیر از جنتامیسین را غیر فعال می کنند نیز یافت شده اند (۱۳-۱۲). بعضی از آنزیم ها مانند *aph(3´)-IIIa* باعث ایجاد مقاومت به نئومایسین و کانامایسین در استافیلوکوکوس ها می شوند. ژن *aph(3´)-IIIa* ممکن است روی کروموزوم یا عوامل ژنتیکی متحرک باشد(۱۴).

شیوع سویه های HLGR انتروکوکوس فکالیس و انتروکوکوس فسیوم در ایران به ترتیب ۴۲٪و ۶۰٪ می باشد (۱۵). در مورد شیوع ژنهای کد کننده مقاومت به آمینوگلیکوزیدها در بین سویه های انتروکوکوس ایران مطالعه ای انجام نشده است. در مطالعه حاضر حضور ژنهای *aac(6) -aph(2´´), aph(2´´)-Ib, aph(2´´) Ic, aph(2´´)-Ia, aph(2´´)Id, aph(3)IIIa, ant(4)-Ia* در بین سویه های انتروکوکوس فکالیس و انتروکوکوس فسیوم ایران با الگوهای مقاومت مختلف مورد بررسی قرار گرفته است.

مواد و روش ها :

۷۹ جدایه انتروکوکوس فکالیس و ۳۵ جدایه انتروکوکوس فسیوم از نمونه های ادراری سه بیمارستان در تهران در طی سالهای ۱۳۸۱ تا ۱۳۸۳ مورد بررسی قرار گرفت. تمامی جدایه ها توسط روش های باکتریولوژیکی معمول تا سطح گونه شناسایی شدند. حساسیت آنتی بیوتیکی این جدایه ها در مطالعه قبلی تعیین شده بود(۱۵). سویه های فوق با استفاده از الکتروفورز مالتی لوکوس و پلازمید پروفایل از نظر ژنتیکی متفاوت تشخیص داده شده بودند(۱۷-۱۶).

E. faecalis ATCC 29212, *Staphylococcus aureus* ATCC25923 , *Escherchia coli* ATCC 1399 به عنوان سویه های کنترل در تستهای باکتریولوژیکی استفاده شدند. همچنین سویه رفرانس JH2-2 که توسط پروفسور B.E. Murray از دانشگاه Texas و سویه HH22 از دانمارک تهیه شدند به عنوان سویه های کنترل استفاده شدند.

تستهای حساسیت آنتی بیوتیکی:

دیسک های جنتامیسین ۱۲۰ میکروگرمی برای تعیین سویه های HLGR استفاده شدند (۱۸). حداقل غلظت ممانعت کننده رشد (MIC) برای جنتامیسین با استفاده از روش رقتی(macrobroth dilution) مطابق استانداردهای NCCLS انجام شدند (۱). جنتامیسین (Sigma, St. Louis, MO) در رقت های 2،4، 8، 16،32 ، 64، 128، 256، 512، 1024 ، 2048و0.125 میلی گرم در میلی لیتر در محیط آبگوشت Muller-Hinton broth تهیه شد. سپس اینوکلوم باکتریایی که شامل 10^{6}-10^{5} سلول تشکیل دهنده کلنی (Colony Forming Unit, CFU) به هر کدام از رقت ها اضافه شد. سویه *E. faecalis* ATCC 29212 به عنوان سویه کنترل استفاده شد. حساسیت این سویه ها به آمیکاسین،کانامایسین، توبرامایسین، استرپتومایسین و نتیل مایسین نیز مطابق روش Kirby-bauer با استفاده از دیسک های آنتی بیوتیکی (Oxoid Hampshire, England) انجام شد (۱۸).

تکثیر ژنهای AMEs :

DNA هر کدام از سویه ها با استفاده از روش انجماد و ذوب سوسپانسیون باکتریائی (freeze and thaw) استخراج گردید(۱۹).سپس با استفاده از پرایمرهای مناسب برای ژنهای *aac(6) -aph(2´´), aph(2´´)-Ib, aph(2´´) Ic, aph(2´´)-Ia, aph(2´´)Id, aph(3)IIIa, ant(4)-Ia* تکثیر گردید.توالی پرایمرها در جدول ۱ آمده است.

تکثیر در حجم نهایی ۲۵µl که شامل ۴۰۰ نانومول از هر پرایمر ، بافر PCR ۱×، $1.5mM\ MgCl_2$، دی متیل سولفوکساید (DMSO) ۱۰٪، 0.5mM dNTPs ، DNA الگو ۱µl وآنزیم Taq پلیمراز ۰،۵ واحد (Fermentase, UAB, Lithuania) انجام شد. همچنین برنامه ترموسایکلر به صورت ۹۴°C برای ۳ دقیقه تنظیم شد بعد از آن ۳۵ سیکل که شامل ۹۴°C – ۴۵ ثانیه،۵۵°C –۴۵ ثانیه در ، ۷۲°C –۱ دقیقه و سیکل نهائی ۷۲°C به مدت ۱۰ دقیقه بود.

محصول PCR توسط الکتروفورز با استفاده از ژل ۱،۵درصد آگارز از یکدیگر جدا شدند. برای تعیین سایز محصولات PCR از یک مارکر مولکولی ۱۰۰ جفت بازی ,Fermentase UAB) (Vilnius, Lithuania استفاده شد. ژل آگارز حاصل با استفاده از ترانس لو میناتور مجهز به دوربین دیجیتال عکس برداری شده و با کنترل های مثبت و منفی مقایسه گردید.

یافته ها:

۵۱ جدایه به فنوتیپ HLGR (MIC>500mg/ml) تعلق داشتند. بقیه جدایه ها یا به مقادیر پایین جنتامیسین (فنوتیپ LLGR ، MIC≤64 ، n=38) مقاوم بودند و یا مقاوم به مقادیر حد وسط(64<MIC<500, n=17) بودند. سویه هایی که دارای سطوح مختلفی از مقاومت نسبت به جنتامیسین بودند برای بررسی ژنهای AMEs استفاده شدند.

ژن های گوناگون کد کننده آنزیم های تغییر دهنده آمینوگلیکوزیدها در بین سویه های *E. faecium* و *E. faecalis* در جدول ۲ نشان داده شده است. تمامی سویه ها با فنوتیپ HLGR در هر دو گونه *E. faecium* (n=17) و *E. faecalis* (n=42) دارای ژن *aac (6´)-aph(2´´)* بودند که حصول PCR آنها قطعه ای به طول ۲۲۲ جفت باز بود. همچنین سویه های دارای مقاومت به مقادیر حدواسط به جنتامیسین نیز دارای این ژن بودند.

رابطه ای بین مقاومت به آمینوگلیکوزیدهای دیگر و حضور ژن *aac(6´)-aph(2´´)* وجود دارد (جدول ۳). از ۱۱۴ جدایه ای که حساسیت آنها به سایر آمینوگلیکوزیدها بررسی شد ۱۰ سویه به جنتامیسین، کانامایسین، آمیکاسین، نتیل مایسین و توبرامایسین حساس بودند. این سویه ها فاقد ژنهای *aac(6´)-aph(2´´)* و *aph(3´´)-IIIa* بودند.

در بین سویه های HLGR گونه های *E. faecalis* (۶۰٪) و *E. faecium* (۶۵٪) بیشترین ژن *aac(6´)-aph(2´´)* بوده و پس از آن *aph(3´)-IIIa* می باشد. شیوع این ژن در بین سویه های LLGR گونه های *E. faecalis* و *E. faecium* به ترتیب ۵۹٪ و ۵۴٪ می باشد.

حضور همزمان ژن های *aac(6´)-aph(2´´)* و *aph(3´)IIIa* در بین سویه های HLGR ، *E. faecalis* ۶۰٪ و *E. faecium* ۶۵٪ می باشد (جدول۲).

ژن *aph(2´´)Ic* در دو سویه از *E. faecium* دیده شد. این دو سویه دارای MIC جنتامیسین ۲۵۶ و 2000µg/ml ≤ بودند.

سایر ژن ها شامل *aph(2´´)Id* ،*ant(4´)Ia* و *aph(2´´)Ib* در مجموعه ایزوله های ما وجود نداشتند.

جدول شماره ۱: ترادف پرایمر های مورد استفاده در تکثیر ژنهای آنزیم های تغییر دهنده آمینوگلیکوزیدها

Gene	Primers	Sizes of PCR products (bp)	References
aac(6′)-aph(2″)	CCAAGAGCAATAAGGGCATA CACTATCATAACCACTACCG	۲۲۲	۱۹،۲۰
aph(2″)-Ic	CCACAATGATAATGACTCAGTTCCC CCACAGCTTCCGATAGCAAGAG	٤٤٤	۱۰
aph(3´)-IIIa	GGCTAAAATGAGAATATCACCGG CTTTAAAAAATCATACAGCTCGCG	٥۲۳	۱۰
aph(2″)-Ib	CTTGGACGCTGAGATATATGAGCAC GTTTGTAGCAATTCAGAAACACCCTT	۸٦۷	۱۰
aph(2″)-Id	GTGGTTTTTACAGGAATGCCATC CCCTCTTCATACCAATCCATATAACC	٦٤۱	۱۰
ant(4′)-Ia	CAAACTGCTAAATCGGTAGAAGCC GGAAAGTTGACCAGACATTACGAACT	۲۹٤	۱۰

جدول شماره ۲: توزیع ژنهای کد کننده آنزیمهای اصلاح کننده آمینوگلیکوزیدها در سویه های آنتروکوکوس فکالیس و آنتروکوکوس فسیوم

AMEs genes	LLGR MIC≤۶۴ n (%)		Intermediate ٦٤<MIC<٥٠٠ n (%)		HLGR MIC>٥٠٠ n (%)	
	E. faecalis	*E. faecium*	*E. faecalis*	*E. faecium*	*E. faecalis*	*E. faecium*
aac(6′)-aph(2″)	۲(۷.۴)	-	۱۰(۱۰۰)	٥(۱۰۰)	۴۲(۱۰۰)	۱۷(۱۰۰)
aph(3´)-IIIa	۱۶(۵۹.۲۵)	۷(۵۳.۸)	۸(۸۰)	٥(۱۰۰)	۲۵(۵۹.۵)	۱۱(۶۴.۷)
aac(6′)-aph(2″) + *aph(3´)-IIIa*	۲(۷.۴)	-	۶(۶۰)	٥(۱۰۰)	۲۵(۵۹.۵)	۱۱(۶۴.۷)
aph(2″)-Ic	–	۱(۷.۶۹)	-	-	-	۱(۵.۸۸)

جدول شماره ۳: توزیع ژن *aac(6′)-aph(2″)* در بین سویه های آنتروکوکوس فکالیس و آنتروکوکوس فسیوم بر اساس فنوتیپ مقاومت

Phenotype of Resistance	**Number of isolates**	PCR results for *aac(6′)-aph(2″)*
Gm, Kan, Ak, Net, Tob	۳٤	+
Gm, Kan, Ak, Tob	۱۲	+
Gm, Kan, Ak, Net	۲	+
Gm, Kan, Tob	۲	+
Gm, Net, Tob	۴	+
Gm, Ak,, Tob	۳	+
Kan, Ak, Tob	۴	+
Kan, Tob	۵	+
Ak, Tob	۵	+
Kan	۱	+
Tob	۴	+
-	۱۰	-

Gm, gentamicin; Kan, Kanamycin; Ak, Amikacin; Net, Netilmicin; Tob, Tobramycin

بحث:

در طی چهار دهه گذشته در ایران آمینوگلیکوزیدها به خصوص جنتامیسین به طور گستردهای در درمان بیشتر عفونتها استفاده شده است، که می تواند یکی از علت های شیوع زیاد سویه های HLGR در بیمارستان های ایران باشد (۱۶). هدف مطالعه حاضر تعیین شیوع AMEs در بین ایزوله های انتروکوکوس کلینیکی در تهران است.

مقاومت به غلظت های بالای انتروکوکوس ها به آمینوگلیکوزیدها معمولا توسط ژن *aac (6´)-aph (2´´)* کد می شود (۱۴،۲۰).

نتایج PCR برای این گروه از ایزوله ها که همگی دارای فنوتیپ HLGR بودند وجود ژن *aac(6´) aph (2´´)* را ثابت کرد. تمامی این سویه ها دارای MIC≥2000µg/ml برای جنتامیسین بودند. همچنین سویه های *E. faecalis* دارای مقاومت حد واسط (n=10) و مقاومت پایین (n=2) به جنتامیسین هم دارای ژن فوق بودند.

سویه هایی که فاقد ژنهای *aac (6´)-aph (2´´)* و *aph (3´) IIIa* بودند به سایر آمینوگلیکوزیدهای به کار برده شده در این مطالعه حساس بودند. این موضوع می تواند اهمیت هر دو آنزیم را در تغییر آمینوگلیکوزیدهای مختلف در مجموعه سویه های انتروکوکوس ایرانی توضیح دهد.

تعداد سویه های انتروکوکوس HLGR ایرانی که دارای ژن *aac(6´) aph(2´´)* هستند (۱۰۰٪) بسیار بیشتر از این تعداد در اسپانیا(۶۴،۷٪) ، چین(۶۸،۸٪) و کویت می باشد (۲۲-۲۱ ،۵). دومین ژن بلحاظ فراوانی که در این مطالعه بررسی شد *aph(3´)-IIIa* بود. آنزیم مربوط به ژن مذکور باعث مقاومت به آمیکاسین گردیده و نقشی در مقاومت به جنتامیسین ندارد (۲). وجود آنزیم مذکور در بین ۵۹٪ از سویه های *E. faecalis* که به مقادیر پایین جنتامیسین مقاوم بودند دیده شده است. اهمیت سویه های فوق در مقاومت به آمیکاسین است. در چنین مواردی ترکیب آمپی سیلین و توبرامایسین و یا موارد مشابه آن می تواند از نظر کلینیکی موثر باشد. دو سویه *E. faecium* با MIC=256 و MIC>2000 دارای ژن *aph(2´´)Ic* بودند. این ژن اولین بار در سال ۱۹۷۷ در یک سویه *E. galinarum* که از حیوان جدا شده بود شناسایی گردید و بعدها در سویه های *E. faecium* و *E. faecalis* انسانی گزارش شد (۹-۸). در مطالعه حاضر تمامی سویه های *E. faecalis* بررسی شده فاقد *aph(2´´)-Ic* بودند. MIC جنتامیسین برای سویه هایی که حاوی این ژن هستند ۳۸۴-۲۵۶ میکروگرم درمیلی لیتر می باشد (۸). مقاومت به مقادیر بالا در دومین دسته از سویه ها که دارای MIC>2000 می باشند به علت حضور ژن *aac(6´)-aph(2´´)* است. سویه های دارای ژن *aph(2´´)-Ic* و فاقد ژن *aac(6´)-aph(2´´)* به طور بالقوه به ترکیب آمپی سیلین با آمیکاسین و نتیل مایسین یا دی بکاسین (Dibekacin) حساس هستند(۲). بنابر این در چنین حالت هایی شناسایی *aph(2´´)-Ic* می تواند در انتخاب آنتی بیوتیک مناسب کمک کند. این مطالعه اولین گزارش از حضور *aph(2´´)-Ic* در بین سویه های انتروکوکوس ایرانی می باشد. تعداد سویه های فوق در ایران کمتر از آنها در کویت است (۲۲).

بیش از ۵۰٪ از سویه های انتروکوکوس ایرانی به مقادیر بالای استرپتومایسین مقاوم هستند(۷). در این مطالعه وجود ژن *ant(6´)-Ia* که در سویه های مقاوم به استرپتومایسین گزارش شده است (۲۲) بررسی نشد. از آنجاییکه سویه های ایرانی مقاومت به مقادیر بالای استرپتومایسین (۳۰۰ µg) نشان می دهند، چنین مقاومتی می تواند در رابطه با آنزیم های تغییر دهنده آمینوگلیکوزیدها باشد.

نتیجه گیری:

سویه های فاقد این ژنها به تمامی آمینو گلیکوزیدهای تست شده در این مطالعه حساس بودند. به دلیل حضور ژن-*aac(6´) aph(2´´)* اغلب سویه های مقاوم به جنتا مایسین به سایر آمینو گلیکوزیدها مقاوم می باشند.

فهرست مراجع:

1. National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS). Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria that Grow Aerobically. 3rd ed. : Approved Standard M7-A6. 2004: NCCLS, Villanova, PA, USA.
2. Chow JW. Aminoglycoside resistance in enterococci. *Clin Infect Dis*. 2000 ; **31(2):**586-589.
3. Miranda G, Lee L, Kelly C, Solórzano F, Leaños B, Muñoz O. *et al.* Antimicrobial resistance from enterococci in a pediatric hospital. Plasmids in *Enterococcus faecalis* isolates with high-level gentamicin and streptomycin resistance. *Arch Med Res*. 2001: **32(2):**159-163
4. Papaparaskevas J, Vatopoulos A, Tassios PT, Avlami A, Legakis NJ, Kalapothaki V.
5. Diversity among high-level aminoglycoside resistant terococci.*J Antimicrob Chemother*. 2000: **45(3):**277-283.
6. Qu TT, Chen YG, Yu YS, Wei ZQ, Zhou ZH, Li LJ. Genotypic diversity and epidemiology of high-level gentamicin resistant Enterococcus in a Chinese hospital. J Infect. 2006; **52(2):**124-130.

7. Murray, B. E. Diversity among multidrug-resistant enterococci. *Emer. Infect. Dis.* 1998; **4**:37-47.
8. Ferretti JJ, Gilmore KS, Courvalin P. Nucleotide sequence analysis of the gene specifying the bifunctional 6´-aminoglycoside acetyltransferase 2"-aminoglycoside phosphotransferase enzyme in Streptococcus faecalis and identification and cloning of gene regions specifying the two activities. *J Bacteriol*. 1986; **167(2)**:631-638.
9. Chow JW, Zervos MJ, Lerner SA, Thal LA, Donabedian SM, Jaworski DD. *et al.* A novel gentamicin resistance gene in Enterococcus. *Antimicrob Agents Chemother*. 1997; **41(3):**511-514.
10. Kao SJ, You I, Clewell DB, Donabedian SM, Zervos MJ, Petrin J. *et al.* Detection of the high-level aminoglycoside resistance gene aph(2")-Ib in *Enterococcus faecium*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2000; **44(10):**2876-2879.
11. Tsai SF, Zervos MJ, Clewell DB, Donabedian SM, Sahm DF, Chow JW. A new high-level gentamicin resistance gene, aph(2´´)-Id, in Enterococcus spp. *Antimicrob Agents Chemother*. 1998; **42(5):**1229-1232.
12. Vakulenko SB, Donabedian SM, Voskresenskiy AM, Zervos MJ, Lerner SA, Chow JW. Multiplex PCR for detection of aminoglycoside resistance genes in enterococci. *Antimicrob Agents Chemother*. 2003; **47(4)**:1423-1426.
13. Carlier C, Courvalin P. Emergence of 4´,4"-aminoglycoside nucleotidyltransferase in enterococci. *Antimicrob Agents Chemother*. 1990 **:34(8):**1565-1569.
14. . Matsumura M, Katakura Y, Imanaka T, Aiba S. Enzymatic and nucleotide sequence studies of a kanamycin-inactivating enzyme encoded by a plasmid from thermophilic bacilli in comparison with that encoded by plasmid pUB110. *J Bacteriol*. 1984; **160(1):**413-420.
15. Ida T, Okamoto R, Shimauchi C, Okubo T, Kuga A, Inoue M. Identification of aminoglycoside-modifying enzymes by susceptibility testing: epidemiology of methicillin-resistant Staphylococcus aureus in Japan. *J Clin Microbiol*. 2001; **39(9):**3115-3121.
16. Feizabadi MM, Asadi S, Aliahmadi A, Parvin M, Parastan R, Shayegh M. *et al.* Drug resistant patterns of enterococci recovered from patients in Tehran during 2000-2003. *Int J Antimicrob Agents.* 2004; **24(5):**521-522.
17. Feizabadi MM, Aliahmadi A, Mobasheri F, Asgharzadeh A, Asadi S, Etemadi G.Phenotypic characteristics and population genetics of Enterococcus faecalis cultured from patients in Tehran during 2000-2001. *Can J Microbiol.* 2003; **49(10):**645-649.
18. Feizabadi MM, Asadi S, Zohari M, Gharavi S, Etemadi G. Genetic characterization of high-level gentamicin-resistant strains of Enterococcus faecalis in Iran. *Can J Microbiol.* 2004; **50(10):**869-872.
19. National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS). 2004. Performance Standards for Antimicrobial Disk SusceptibilityTests. 5th ed.: Approved Standard M2-A8. NCCLS, Villanova, PA, USA.
20. Rossello-Mora, R. and R. Amann. The species concept for prokaryotes. *FEMS. Microbiol. Rev.* 2001; **25**:39-67.
21. Culebras E, Martínez JL. Aminoglycoside resistance mediated by the bifunctional enzyme6´-N-aminoglycoside etyltransferase-2"-O-aminoglycoside phosphotransferase *Front Biosci.* 1999; **4**:D1-8.
22. del Campo R, Tenorio C, Rubio C, Castillo J, Torres C, Gómez-Lus R. Aminoglycoside-modifying enzymes in high-level streptomycin and gentamicin resistant Enterococcus spp. in Spain. *Int J Antimicrob Agents.* 2000; **15(3):**221-226.
23. Udo EE, Al-Sweih N, John P, Chugh TD. Antibiotic resistance of enterococci isolated at a teaching hospital in Kuwait. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2002; **43(3)**:233-238.

مجله میکروب شناسی پزشکی ایران
سال ۱ شماره ۱ بهار ۱۳۸۶، صفحات ۱۷ – ۲۲

شناسایی موتاسیونهای ژن*rpoB* در سویه های مایکوباکتریوم توبرکلوزیس مقاوم به ریفامپین جدا شده از بیماران ایرانی

فرحنوش دوستدار*[۱] ، آذر دخت خسروی[۱] ، پریسا فرنیا[۲] ، احمد رضا بهره مند[۳] .

۱) گروه میکروبشناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی جندی شاپور اهواز
۲) مرکز رفرانس سل کشوری ، بیمارستان مسیح دانشوری تهران.
۳) انستیتو پاستور ایران.
نویسنده رابط: فرحنوش دوستدار، گروه میکروبشناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی جندی شاپور اهواز،
تلفن: ۰۹۱۲۳۷۹۰۷۰ f_doustdar@yahoo.com

تاریخ دریافت مقاله : ۸۶/۳/۶ تاریخ پذیرش مقاله : ۸۶/۳/۲۲

چکیده:

زمینه و اهداف: در این تحقیق ، فراوانی موتاسیون ها در ناحیه پر موتاسیون بسیار متغیر ژن rpoB سویه های مایکوباکتریوم توبرکلوزیس مورد بررسی قرار گرفت. این سویه ها مقاوم یا حساس به ریفامپین بوده و از بیماران مبتلا به سل مراجعه کننده به مرکز رفرانس سل کشوری و مرکز رفرانس سل اهواز، جدا شده بودند. هدف از این تحقیق بررسی چگونگی تاثیر غربالگری مولکولی این ناحیه از ژن rpoB در نمونه های بیماران مبتلا به سل در تشخیص سریع موارد مایکوباکتریوم توبرکلوزیس مقاوم به ریفامپین بود.

روش بررسی: تعداد ۲۵ نمونه مایکوباکتریوم توبرکلوزیس مقاوم به ریفامپین و ۵ مایکوباکتریوم توبرکلوزیس حساس به ریفامپین جدا شده از بیماران بصورت تصادفی برای انجام این تحقیق انتخاب شد. ناحیه RRDR کلیه نمونه های انتخاب شده پس از تکثیر به وسیله PCR ، کاملا سکانس شد تا انواع و فراوانی موتاسیونهای مرتبط با مقاومت به ریفامپین در این ناحیه بررسی شود.

یافته ها: بر اساس نتایج حاصله ، ۹۶٪ از سویه های مقاوم به ریفامپین ، تغییرات ژنتیکی در ناحیه RRDR را نشان دادند و ۷۲ درصد از سویه های مایکوباکتریوم توبرکلوزیس مقاوم به ریفامپین دارای موتاسیونهای missense بودند که منجر به عوض شدن اسید آمینه در کدون ۵۳۱ (۶۰٪)، کدون ۵۲۶ (۱۶٪) و کدون ۵۱۶ (۸٪) در ناحیه مرکزی ژن rpoB گردیده بود. در حالیکه در تحقیق ما مانند سایر نقاط دنیا کدون ۵۳۱ دارای بیشترین تغییر بود ولی فراوانی موتاسیون در دو کدون شایع دیگر یعنی ۵۲۶ و ۵۱۶ متفاوت از فراوانی موتاسیون گزارش شده از سایر نقاط دنیا بود. این نفاوتها ممکن است ناشی از تغییرات ژنی جغرافیایی در نژادهای مایکوباکتریوم توبرکلوزیس مقاوم به ریفامپین و انتقال این نژادها در بیماران در کشورهای مختلف باشد.

نتیجه گیری: میزان بالای موتاسیون در ناحیه RRDR نمونه های مایکوباکتریوم توبرکلوزیس مقاوم به ریفامپین جدا شده از بیماران، تائید کننده این مطلب است که غربالگری لین ناحیه ژنی برای تعیین مقاومت به ریفامپین در نمونه های کلینیکی مایکوباکتریوم توبرکلوزیس جدا شده از ایران مناسب است.

کلید واژه ها: مایکوباکتریوم توبرکلوزیس، ریفامپین، مقاومت دارویی، موتاسیون.

مقدمه:

در مطالعات اپیدمیولوژیک بیماری سل مقاومت دارویی از اهمیت ویژه ای برخوردار است. مقاومت چند دارویی که به صورت مقاومت هم زمان به حد اقل دو داروی ایزونیازید و ریفامپین تعریف می شود، در بسیاری از کشورها به بیش از ده درصد می رسد و به نظر می رسد امروزه خیلی بیشتر از آنچه در گذشته نشان داده شده بود گسترش پیدا کرده است (۱ و ۲).

به تازگی نواحی جدیدی باشیوع بالای سل مقاوم به چند دارو در کشورهای پر جمعیتی مانند چین وایران شناسایی شده است. در ایران در بین موارد جدید ابتلای به سل شیوع مقاومت به حداقل یک دارو به ۵ درصد می رسد و شیوع مقاومت چند دارویی در بین موارد قبلا درمان شده به ۴۸/۲ درصد میرسد(۳).

ریفامپین به عنوان داروی ضد سل در سال ۱۹۷۲ معرفی شد و از آن موقع به عنوان یک جزء کلیدی در درمان چند دارویی ضد سل مطرح است. ریفامپین یک داروی باکتریسیدال است و به ساب یونیت ß آنزیم RNA پلیمراز وابسته به DNA متصل می شود و مانع شروع رونویسی می گردد(۴).

استفاده گسترده از ریفامپین و سایر مشتقات ریفامایسین موجب ظهور مقاومت به ریفامپین گردیده است(۵).

در مطالعات متعدد نشان داده شده است که موتاسیون در ژن *rpoB* که کد کننده ساب یونیت ß آنزیم RNA پلیمراز است، بطور مشخص در ارتباط با فنوتایپهای مرتبط با ریفامپین می باشد(۶). بیش از ۷۰ نوع موتاسیون متفاوت در ژن *rpoB* برای نمونه های مایکوباکتریوم توبرکلوزیس مقاوم به ریفامپین از سراسر جهان گزارش شده است(۷).

موتاسیونها در ژن *rpoB* بیشتر در یک ناحیه bp ۸۱ به نام ناحیه تایین کننده مقاومت به ریفامپین (RIF resistance-determining region) یا RRDR صورت می گیرد. از آنجاییکه تا ۹۰ درصد نمونه های مقاوم به ریفامپین دارا ی موتاسیون در کدونهای ۵۳۱ و ۵۲۶ و۵۱۶ ناحیه RRDR هستند این ناحیه برای تشخیص سریع نمونه های مقاوم به ریفامپین استفاده می شود (۸ و ۹). اگرچه نشان داده شده است که آنالیز مولکولی ژن *rpoB* در بیش از ۹۰ درصد نژادهای مقاوم به ریفامپین از نواحی جغرافیایی مختلف برای تشخیص مقاومت به ریفامپین مفید بوده است، اما اطلاعات کمی از ناحیه آسیای خاور میانه در دست است(۱۰).

برای تعیین اینکه آیا غربالگری مولکولی ناحیه RRDR ژن *rpoB* برای تشخیص نمونه های مقاوم به ریفامپین در ایران مفید است، ما فراوانی موتاسیونها را در ناحیه RRDR ژن *rpoB* در ۲۵نمونه مایکوباکتریوم توبرکلوزیس مقاوم به ریفامپین و ۵ نمونه مایکوباکتریوم توبرکلوزیس حساس به ریفامپین با روش سکانس مستقیم کل ناحیه RRDR مورد بررسی قرار دادیم.

مواد و روش ها:

انتخاب نمونه و تعیین حساسیت آنتی بیوتیکی : تعداد ۲۵ نمونه مایکوباکتریوم توبرکلوزیس مقاوم به ریفامپین و ۵ مایکوباکتریوم توبرکلوزیس حساس به ریفامپین جدا شده از بیماران مبتلا به سل مراجعه کننده به مرکز رفرانس سل کشوری و مرکز رفرانس سل اهواز طی سال ۲۰۰۶، بصورت تصادفی برای انجام این تحقیق انتخاب شدند. با استفاده از تستهای معمول شامل میکروسکوپی، کشت و نتایج مثبت در تست نیاسین ونیترات و کاتالاز باکتری ها بعنوان مایکوباکتریوم توبرکلوزیس شناسایی شدند(۱۱). *M. tuberculosis* strains H37RvT and CDC 1551 نیزبه عنوان کنترل مورد استفاده قرار گرفت. حساسیت دارویی نمونه های مورد استفاده در این تحقیق با استفاده از روش کشت روی محیط لوون اشتاین جانسن حاوی غلظت معین از دارو بررسی شد. غلظت ریفامپین برابر 1µg در هر 1ml محیط بود. اگر تعداد کلنی های باکتری که روی محیط واجد ریفامپین رشد می کرد کمتر از ۱ درصد کلنی هایی بود که روی محیط فاقد ریفامپین رشد می کرد، بود باکتری به عنوان حساس به ریفامپین و اگر برابر یا بیشتر از ۱ درصد بود، باکتری به عنوان مقاوم به دارو تعیین می گردید(۱۱ و ۱۲).

استخراج DNA : DNA ژنومی با استفاده از روش van Soolingen با تغییرات جزئی استخراج شد(۱۳). باکتری های رشد یافته بر روی محیط لوون اشتاین جانسن برداشت شده و با استفاده از حرارت ۸۰ درجه سانتی گراد به مدت ۲۰ دقیقه در بن ماری کشته شدند. سپس باکتری ها به مدت ۱ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد با لیزوزیم انکوبه شدند و به دنبال آن عمل تخریب دیواره سلولی با استفاده از 50 µg proteinase K in 10% SDS به مدت ۳۰ دقیقه در ٦٥ درجه سانتیگراد انجام شد. سپس انکوباسیون به مدت ۱۰ دقیقه در ٦٥ درجه با CTAB/NaClانجام شد و عمی رسوب دهی با استفاده از مخلوط کلروفرم/ ایزوآمیل الکل (24: 1, v/v) انجام شد. در نهایت DNA ژنومی با استفاده از مخلوط فنل/ کلروفرم استخراج شد و با استفاده ازاتانل ۱۰۰ درصد رسوب داده شد(۱۳).

تکثیر قطعه ژنومی نمونه های مایکوباکتریوم با استفاده از PCR : 10–20 ng از DNA مایکوباکتریایی استخراج شده به واکنش PCR اضافه گردید. قطعه bp ۱۵۷ از ژن rpoB با استفاده از پرایمرهای rpob F , rpobR (5-GGTCGGCATGTCGCGGATGG-3) و (5-GTAGTGCGACGGGTGCACGTC-3) تکثیر شد(۱۴). تکثیر با برنامه زیر انجام شد: یک مرحله Denaturation اولیه در ۹۵ درجه به مدت ۵ دقیقه، سپس ۳۰ سیکل ۹۵ درجه به مدت ۱۵ ثانیه، ۶۲ درجه به مدت ۱۵ ثانیه، ۷۲ درجه به مدت ۱۵ ثانیه و در آخر Extension نهایی به مدت ۵ دقیقه در ۷۲ درجه. هر µl ۵۰ از مخلوط واکنش حاوی 2MgCl ۱ mM، ۲۰۰ nM از هر پرایمر، ۱۰۰µM از هر داکسی نوکلئوتید تری فسفات، ۱۰ng از DNA الگو، ۱۰ µl of 10XPCR buffer (Fermentas) و AmpliTaq ۱U Gold (Fermentas) بود. وجود DNA تکثیر شده bp ۲۵۰ توسط الکتروفورز در ژل آگارز تایید شد.

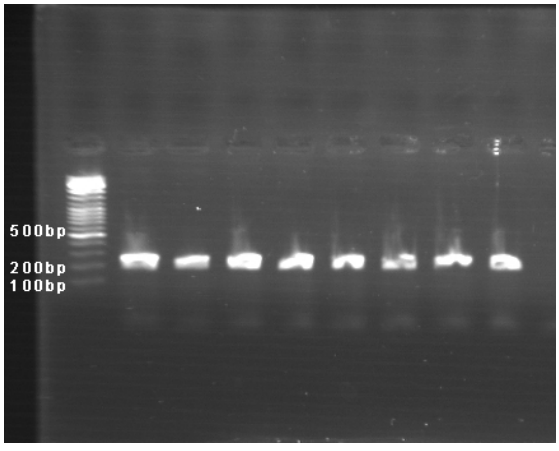
خالص سازی و سکانس محصول PCR : محصولات PCR با استفاده از کیت خالص سازی محصول PCR (Roche) خالص سازی شدند و نوکلئوتیدهای قطعات PCR شده توسط شرکت MWG آلمان سکانس شدند.

بررسی سکانس DNA : DNA سکانس شده با استفاده از برنامه های MEGA و DNAMAN آنالیز شدند و با سکانس نژادهای استاندارد CDC 1551, H37RV مقایسه شدند.

یافته ها :

کلیه سویه ها با استفاده از خصوصیات میکروسکپی و فنوتیپی استاندارد به عنوان مایکوباکتریوم توبرکلوزیس مورد تائید قرار گرفتند. در همه این نمونه های کلینیکی ناحیه متغیر ژن rpoB پس از تکثیر سکانس شد. ده موتاسیون missense در کدونهای ۴۹۰، ۵۱۳، ۵۱۶، ۵۲۲، ۵۲۶، ۵۳۱ و ۵۳۳ در ۲۲ نمونه مقاوم به ریفامپین (۸۸ درصد) مشاهده شد (جدول) . موتاسیون در کدون ۵۳۱ در ۱۴ (۵۶ درصد) ، در کدون ۵۲۶ در ۴ نمونه (۱۶ درصد) و در کدون ۵۱۶ در ۲ نمونه (۸ درصد) مشاهده شد. شایعترین تغییرات جایگزینی اسید آمینه تریپتوفان به جای اسید آمینه سرین در کدون ۵۳۱ در ۱۲ نمونه (۴۸ درصد) و جایگزینی هیستیدین به جای تیروزین در کدون ۵۲۶ در ۳ نمونه (۱۲ درصد) بود. یک موتاسیون در کدون ۵۱۳ که موجب جایگزینی گلایسین به جای پرولین شده بود در یک نمونه و یک موتاسیون در کدون ۵۲۲ که موجب جایگزینی سرین به جای لوسین شده بود در نمونه دیگر شناسایی شد. دو نمونه مایکوباکتریوم توبرکلوزیس مقاوم به ریفامپین (۱۲ درصد) دارای موتاسیونهای missense در کدونهای جداگانه شامل کدون ۴۹۰ (در خارج منطقه متغیر) و کدون ۵۲۶ (۴ درصد) و در دیگری در کدونهای ۴۹۰ و ۵۳۱ (۴ درصد) بودند. یک نمونه دارای موتاسیون خاموش در کدون ۴۹۰ بهمراه موتاسیون missense در کدون ۵۱۳ و یک نمونه دارای یک موتاسیون خاموش در کدون ۵۴۰ بود. یک نمونه مقاوم به ریفامپین دارای چندین موتاسیون خاموش در کدونهای ۵۰۷، ۵۱۳ و ۵۳۴ بود. هیچ تغییر ژنی در ۱ نمونه (۴ درصد) از ۲۵ نمونه مقاوم به ریفامپین مشاهده نشد. ۵ نمونه حساس به ریفامپین که به عنوان کنترل بررسی شده بودند حاوی هیچ موتاسیونی در این ناحیه نبودند.

شکل : ژل آگارز حاوی قطعه bp ۲۵۰ تکثیر شده شامل منطقه متغیر ژن rpoB



جدول: تغییرات ژنتیکی ژن rpoB در ۲۵ نمونه مایکوباکتریوم توبرکلوزیس مقاوم به ریفامپین از بیماران ایرانی

Codon(s)	Amino acid substitution(s)	Mutation(s)	No. of isolates (%)
٤٩٠،٥٢٦	Gln3 His ; His3Tyr	CAG3CAT; CAC3TAC	١(٤،٠) [a]
٤٩٠،٥٣١	Gln3His; Ser3Leu	CAG3CAT;TCG3TTG	١(٤،٠) [a]
٤٩٠،٥٣١	Gln3Gln; Ser3Leu	CAG3CAT;TCG3TTG	١(٤،٠) [b]
٥١٣،٥٣٤،٥٠٧	Gly3Gly; Glu3Glu; Gly3Gly	GGC3GGA;CAA3CAG GGG3GGC	١(٤،٠) [c]
٥١٣	Gln3Pro	CAA3CCA	١(٤،٠)
٥١٦	Asp3Val	GAC3GTC	١(٤،٠)
٥١٦	Asp3Tyr	GAC3TAC	١(٤،٠)
٥٢٢	Ser3Leu	TCG3TTG	١(٤،٠)
٥٢٦	His3Tyr	CAC3TAC	٢(٨،٠)
٥٢٦	His3Asp	CAC3GAC	١(٤،٠)
٥٣١	Ser3Leu	TCG3TTG	١٠(٤٤،٠)
٥٣١	Ser3Trp	TCG3TGG	٢(٨،٠)
٥٣٣	Leu3Pro	CTG3CCG	١(٤،٠)
٥٤٠	Arg3Arg	CGT3CGG	١(٤،٠)
No mutation			١(٤،٠)
			Total ٢٥(١٠٠)

a موتاسیون همزمان در دو کدون ۴۹۰ و ۵۲۶ در یک نمونه و موتاسیون همزمان در در دو کدون ۴۹۰ و ۵۳۱ نیز در یک نمونه مشاهده شد

b. موتاسیون Silent در کدون ۴۹۰ همراه با موتاسیون missens در کدون ۵۳۱ مشاهده شد.

c.سه موتاسیون Silent در یک نمونه مشاهده شد.

بحث :

ریفامپین یک داروی کلیدی در درمان سل است و ایجاد مقاومت بر علیه آن معمولا شاخصی برای سل مقاوم به درمان است(۱۵). بیشتر نژادهای مقاوم به ریفامپین در نتیجه بروز مقاومت در ناحیه bp ۸۱ ناحیه بسیار متغیر ژن rpoB که کد کننده ساب یونیتß آنزیم RNA پلیمراز است، ایجاد می شوند(۱۶). تغییرات ژنتیکی در این ناحیه با فراوانی بالای ۹۶ درصد در نمونه های ایرانی مورد بررسی ما مشاهده شد. در این تحقیق مشاهده شد که ۷۲ درصد نمونه های مقاوم به ریفامپین دارای موتاسیون missense بودند که منجر به جایگزینی اسید آمینه های سرین در کدون ۵۳۱ (۶۰٪)، هیستیدین در کدون ۵۲۶ (۱۶٪) یا آسپارژین در کدون ۵۱۶ (۸٪) در ناحیه مرکزی ژن rpoB بودند. در حالیکه در تحقیق ما مانند نتایج گزارش شده از سایر نقاط جهان کدون ۵۳۱ رایج ترین محل بروز موتاسیون بود، موتاسیون در دو کدون رایج دیگر یعنی کدونهای ۵۲۶ و ۵۱۶ در نژادهای ما با فراوانی متفاوت از نواحی جغرافیایی دیگر بود(۱۷ و ۱۸). حدود ۸ درصد از نمونه های

مایکوباکتریوم توبرکلوزیس مقاوم به ریفـامپین دارای موتاسـیون در کدون ۵۳۳ بودند. این موتاسیون با فراوانی کم (۳/۳٪) یا بندرت در نـواحـی جغرافیـایی دیگـر گـزارش شـده اسـت (۱۹ و ۲۰). ایـن تفاوت ها ممکن است مربوط به تفاوت های ژنتیکی جغرافیـایی در نژادهای مایکوباکتریوم توبرکلوزیس مقاوم به ریفامپین و انتقال ایـن نژادها در بین بیماران در کـشورهای مختلـف باشـد. دو موتاسـیون همزمان در ۳ نمونه (۱۲٪) شناسایی شد کـه ایـن نمونـه هـا دارای موتاسیون ثانویه ای در خارج از ناحیه بسیار متغیر بودند. تحقیقـات قبلـی(۲۱ و ۲۲) نیـز موتاسـیونهای خـارج از ناحیـه متغیـر را در کدونهای ۵۳۴، ۵۳۵، ۵۰۴، ۵۴۱، ۵۵۳ و ۵۷۲ گزارش کرده اند. هیچ موتاسیونی در یکی از نمونه های مقاوم به ریفـامپین (۴٪) مـشاهده نشد که این نتیجه مـشابه نتـایج بدسـت آمـده از تحقیقـات قبلـی اسـت(۲۳). مطالعـات قبلـی نـشان داده اسـت کـه در ایـن نمونـه موتاسیون ممکن است در خارج از ناحیه مـورد بررسـی مـا انجـام گرفته باشد(۲۴). احتمالات دیگر اینست که در این نژادهای مقـاوم سایر موتاسیونهای نـادر ژن rpoB صـورت گیـرد یـا مخلـوطی از نژادهای مقاوم همراه با نژادهای حساس وجود داشته باشـند یـا بـه احتمال کمتر مکانیسم های دیگر مقاومت وجود داشته باشند(۲۵).

نتیجه گیری:

در نتیجه گیری می توان گفت که الگوی کلی موتاسیونها در ناحیه ۸۱ bp ژن rpoB در نمونه های ما مشابه نتایج بـه دسـت آمـده از نمونه های اکثر نقاط دنیا بوده است. اطلاعات بیشتر در مـورد ایـن موتاسیونها برای توسعه تکنیکهای مولکولی تشخیصی جدید مناسب هستند و این میزان بالای موتاسـیون در ناحیـه متغیـر ژن rpoB در نمونه های ایرانی بیانگر آنست که غربالگری این ناحیه برای تعیـین مقاومت به ریفامپین در نمونه های کلینیکی به دست آمده از بیماران ایرانی مناسب است.

تقدیر و تشکر:

ایـن تحقیـق بااسـتفاده از بودجـه طـرح هـای تحقیقـاتی معاونـت پژوهشی دانشگاه علـوم پزشـکی جنـدی شـاپور انجـام گرفتـه کـه مولفین مراتب سپاس خود را اعلام می دارنـد. بـا تـشکر فـراوان از خانم اسکندری و آقای کمائی از مرکز رفـرانس سـل اهـواز کـه در تهیه نمونه مارا یاری دادند.

فهرست مراجع:

1. McCammon MT, Gillette JS , Thomas DP , Ramaswamy SV , Graviss EA , Kreiswirth BN *et al*. Detection of rpoB Mutations Associated with Rifampin Resistance in Mycobacterium tuberculosis Using Denaturing Gradient Gel Electrophoresis. *Antimicrob Agents Chemother* 2005; **49**(6): 2200–2209.
2. World Health Organization**.** Global tuberculosis control: surveillance, planning, financing. W.H.O. report 2004.331, World Health Organization, Geneva, Switzerland.
3. Espinal MA, Laszlo A, Simonsen L, Boulahbal F, Kim SJ, Reniero A, *et al.* Global Trends in Resistance to Antituberculosis Druges *the N Engl J Med* 2001; **344(17):**1294-1303.
4. Espinal, M. A. The global situation of MDR-TB, *Tuberculosis* 2003; 83:44–51.
5. Chaisson, R. E. Treatment of chronic infections with rifamycins: is resistance likely to follow? *Antimicrob Agents Chemother* 2003; **47**:3037–3039.
6. Van Der Zanden, A. G. M., E. M. Te Koppele-Vije, N. Vijaya Bhanu, D. Van Soolingen, and L. M. Schouls. Use of DNA extracts from Ziehl-Neelsen stained slides for molecular detection of rifampin resistance and spoligotyping of Mycobacterium tuberculosis. *J. Clin. Microbiol* 2003; **41**:1101–1108.
7. Tang, X., S. L. Morris, J. J. Langone, and L. E. Bockstahler. Microarray and allele specific PCR detection of point mutations in *Mycobacterium tuberculosis* genes associated with drug resistance *J Microbiol Methods* 2005; **63:**318–330.
8. Kocagoz, T., Z. Saribas, and A. Alp. Rapid determination of rifampin resistance in clinical isolates of *Mycobacterium tuberculosis* by real-time PCR *J Clin Microbiol* 2005; **43:**6015–6019.
9. Hirano, K., C. Abe, M. Takahashi. Mutations in the rpoB gene of rifampin-resistant Mycobacterium tuberculosis strains isolated mostly in Asian countries and their rapid detection by line probe assay *J Clin Microbiol 1999*; **37**:2663–2666.
10. Lee AS.G, Lim IH.K , Tang LL.H, Wong S.Y, High Frequency of Mutations in the rpoB Gene in Rifampin-Resistant Clinical

Isolates of Mycobacterium tuberculosis from Singapore. *J Clin Microbiol* 2005; **43**(4): 2026-2027.
11. Kent, P. T. & Kubica, G. P, Public Health Mycobacteriology, a Guide for the Level III Laboratory. Atlanta: US Department of Health and Human Services, Centers for Disease Control and Prevention. 1985.
12. Inderlied, C. B. & Nash, K. A. Antimycobacterial agents: in vitro susceptibility testing, spectra of activity, mechanisms of action and resistance, and assays for activity in biologic fluids, In Antibiotics in Laboratory Medicine, 4th edn, Edited by V. Lorain. Baltimore: Williams & Wilkins; 1996. pp. 127–175.
13. van Soolingen, D., de Haas, P. E., Hermans, P. W. & van Embden, J. D, DNA fingerprinting of Mycobacterium tuberculosis, *Methods Enzymol* 1994; **235**:196–205.
14. Nikolayevsky, V., Brown, T., Balabanova, Y., Ruddy, M., Fedorin, I., and Drobniewski, F., Detection of Mutations Associated with Isoniazid and Rifampin Resistance in Mycobacterium tuberculosis Isolates from Samara Region, Russian Federation, *J Clin Microbiol* 2004; **42**(10): 4498–4502.
15. Kapur, V., Li, L.-L., Iordanescu, S., Hamrick, M. R., Wanger, A., Kreisworth, B. N., & Musser, J. M, Characterization by automated DNA sequencing of mutations in the gene (rpoB) encoding the RNA polymerase b subunit in rifamipin resistant Mycobacterium tuberculosis strains from New York City and Texas. *J Clin Microbiol*1994; **32**: 1095–1098.
16. Ramaswamy, S., & Musser, J. M, Molecular genetic basis of antimicrobial agent resistance in Mycobacterium tuberculosis 1998 update. *Tubercle Lung Dis*1998; **79**: 3–29.
17. Qian, L., Abe, C., Lin, T. P., Yu, M. C., Cho, S. N., Wang, S. & Douglas, J. T, rpoB genotypes of Mycobacterium tuberculosis Beijing family isolates from East Asian countries. *J Clin Microbiol* 2002; **40**: 1091–1094.
18. Pozzi, G., Meloni, M., Iona, E., Orru, G., Thoresen, O. F., Ricci, M. L., *et al.* rpoB mutations in multidrug-resistant strains of Mycobacterium tuberculosis isolated in Italy *J Clin Microbiol* 1999; **37**: 1197–1199.
19. Mani, C., Selvakumar, N., Narayanan, S. & Narayanan, P. R., Mutations in the rpoB gene of multidrug-resistant Mycobacterium tuberculosis clinical isolates from India. *J Clin Microbiol* 2001; **39**: 2987–2990.
20. Bartfai, Z., Somoskovi, A., Kodmon, C., Molecular characterization of rifampin-resistant isolates of Mycobacterium tuberculosis from Hungary by DNA sequencing and the line probe assay. *J Clin Microbiol* 2001; **39**:3736–3739.
21. Mani, C., Selvakumar, N., S. Narayanan, S. and Narayanan, P. R., Mutations in the rpoB gene of multidrug-resistant Mycobacterium tuberculosis clinical isolates from India *J Clin Microbiol* 2001; **39**:2987–2990.
22. Schilke, K., Weyer, K., Bretzel, G., Amthor, B., Brandt, J., Sticht-Grohn, V., *et al.* Universal pattern of rpoB gene mutations among multidrug-resistant isolates of Mycobacterium tuberculosis complex from Africa. *Int J Tuber Lung Dis*1999; **3**: 620–626.
23. Mokrousov, I., Bhanu, N. V., Suffys, P. N., Kadival, G. V., Yap, S. F., Cho, S. N., *et al.* Multicenter evaluation of reverse line blot assay for detection of drug resistance in Mycobacterium tuberculosis clinical isolates. *J Microbiol Methods* 2004; **57**:323–335.
24. Heep, M., Rieger, U., Beck, D. and Lehn, N., Mutations in the beginning of the rpoB gene can induce resistance to rifamycins both in Helicobacter pylori and Mycobacterium tuberculosis. *Antimicrob Agents Chemother* 2000; **44**: 1075–1077.
25. Heep, M., Brandtsta¨tter, B., Rieger, U., Lehn, N., Richter, E.,¨sch-Gerdes, S. Ru. And Niemann, S., Frequency of rpoB mutations inside and outside the cluster I region in rifampin resistant clinical Mycobacterium tuberculosis isolates *J Clin Microbiol* 2001; **39**:107–110.

مجله میکروب شناسی پزشکی ایران

سال ۱ شماره ۱ بهار ۱۳۸۶، صفحات ۲۳ – ۳۱

جدا سازی سویه های سودوموناس آئروژینوزا تولید کننده متالوبتالاکتاماز از بیماران مبتلا به عفونتهای سوختگی و شناسایی ژنهای bla_{VIM} bla_{IMP} با روش PCR

فاطمه میهنی ،آذر دخت خسروی[×]

گروه میکروبشناسی و مرکز تحقیقات بیماریهای عفونی و گرمسیری ، دانشکده پزشکی ، دانشگاه علوم پزشکی جندی شاپور اهواز

نویسنده رابط : آذردخت خسروی، گروه میکروبشناسی و مرکز تحقیقات بیماریهای عفونی و گرمسیری دانشگاه، دانشکده پزشکی ، دانشگاه علوم پزشکی جندی شاپور اهواز تلفن: ۰۶۱۱-۳۳۳۰۰۷۴ فکس: ۰۶۱۱-۳۳۳۲۰۳۶ khosraviaz@yahoo.com

تاریخ دریافت مقاله : ۸۶/۳/۶ تاریخ پذیرش مقاله : ۸۶/۳/۲۲

چکیده:

زمینه و اهداف: سودوموناس آئروژینوزا یکی از عوامل مهم عفونت های بیمارستانی خصوصاً در بیماران مبتلا به نقص سیستم ایمنی می باشد. برای درمان عفونت های شدید ناشی از این میکروارگانیسم آنتی بیوتیکهای متعددی از جمله بتالاکتامها به کار می روند. شیوع بیمارستانی سویه‌های مقاوم به آنتی بیوتیک های بتالاکتام بسیار گزارش شده است که از مهمترین عوامل دخیل در این مقاومت ها، تولید آنزیم های بتالاکتاماز می‌باشد. از جمله این آنزیم ها می توان به متالوبتالاکتامازها اشاره نمود که این آنزیم ها طیف سوبسترای وسیعی داشته و همه بتالاکتامها را، به جز مونوباکتام آزترئونام، هیدرولیز می کنند. در تحقیق حاضر فراوانی تولید متالوبتالاکتاماز در ایزوله های سودوموناس آئروژینوزا مقاوم به ایمیپنم مورد ارزیابی قرار گرفت.

روش بررسی: در ابتدا الگوی مقاومت آنتی بیوتیکی ۱۰۰ ایزوله بالینی سودوموناس آئروژینوزا، که از همین تعداد بیمار مبتلا به عفونت های سوختگی بستری در بیمارستان طالقانی اهواز جدا شده بودند، با تست دیسک دیفیوژن به روش کربی- بائر تعیین شد. تمام ایزوله های کلینیکی سودوموناس آئروژینوزا مقاوم به ایمیپنم توسطEtest ایمیپنم/ایمیپنم به اضافهEDTA (Etest Metallo-ß-Lactamase) برای تولید متالوبتالاکتاماز غربالگری شدند. استخراجDNA از کلنی های کشت خالص توسط روش جوشانیدن ساده انجام گرفت. DNAهای استخراج شده با استفاده از پرایمرهای اختصاصی برای ژن های VIMوIMP متالوبتالاکتاماز توسط روش PCR مورد بررسی قرار گرفتند.

یافته ها : بر اساس نتایج حاصله درصد مقاومت ایزوله ها به شرح زیر بود: سفپیم۱۰۰٪ ، سفتازیدیم۸۱٪ ، تیکارسیلین۷۰٪، ایمیپنم۴۱٪ ، مروپنم۲۳٪ و پیپراسیلین۲۰٪ . در بررسی تولید متالوبتالاکتاماز با روش Etest MBL در ایزوله های مقاوم به ایمیپنم، مشخص شد که ۸ ایزوله از۴۱ ایزوله مقاوم (۱۹/۵۱٪) متالوبتالاکتاماز مثبت بودند. از ۴۱ ایزوله سودوموناس آئروژینوزامقاوم به ایمیپنم جدا شده در طول این دوره تحقیق ۸ ایزوله ای که با روشEtest MBL مثبت شده بودند دارای ژنVIM بودند و و ایزوله ای که ژنIMP را داشته باشد شناسایی نشد و ۳۳ ایزوله باقیمانده (۸۰/۴۹٪)برای هر دو ژنهای VIM وIMP منفی شدند.

نتیجه گیری: نتایج این تحقیق نشان می دهد که همانند سایر تحقیقات انجام شده در دیگر نقاط جهان میزان سویه‌های مقاوم به آنتی بیوتیک سودوموناس آئروژینوزا رو به افزایش است و تولید متالوبتالاکتاماز می تواند یکی از دلایل این امر باشد.

کلید واژه ها: سودوموناس آئروژینوزا، مقاومت آنتی بیوتیکی، متالوبتالاکتاماز

مقدمه :

سودوموناسها باسیلهای گرم منفی،هوازی و متحرک هستند. سودوموناس آئروژینوزا اغلب به تعداد کم فلورطبیعی روده و پوست انسان را تشکیل می دهد(۱) و پاتوژن فرصت طلب در بیماران دچار اختلال سیستم دفاعی می باشد(۲). معرفی کرباپنمها به دنیای پزشکی یک امتیاز بزرگ جهت درمان عفونت های جدی باکتریایی که توسط باکتریهای مقاوم به بتالاکتامها ایجاد شده اند محسوب می‌شود که این بدلیل طیف وسیع فعالیت آنها و پایداری شان در برابر اکثرآنزیمهای بتالاکتاماز می باشد(۳). مقاومت به کرباپنمها درگونه های غیر تخمیری مانند سودوموناس آئروژینوزا بیشتر مشاهده شده است که شایعترین مکانیسم های مقاومت به دلیل کاهش نفوذ دارو و تولید بتالاکتامازهای هیدرولیزکننده کرباپنمها می باشد(٤،٥). گزارشاتی حاکی ازتوانایی متالوبتالاکتامازها (MBLs)در هیدرولیز کرباپنمها دردست است و سوشهای سودوموناس آئروژینوزا حامل ژنهای متالوبتالاکتاماز یک تهدید کلینیکی جدی می‌باشند(٦). سودوموناس آئروژینوزا تولید کننده متالوبتالاکتاماز اولین بار از ژاپن در سال ۱۹۹۱ گزارش شد و پس از آن از نواحی مختلف دنیا شامل آسیا، اروپا، استرالیا، آمریکای شمالی و جنوبی شناسایی و گزارش گردیده است(۷،۸).متالوبتالاکتامازها در کلاس B طبقه بندی Ambler و گروه ۳ از طبقه بندی Bush و همکاران جای دارند که به کاتیونهای دو ظرفیتی (مانند فلز روی) بعنوان کوفاکتور برای فعالیت آنزیمی خود نیاز دارند(۴،۶). متالوبتالاکتامازهاآنزیمهایی هستند که توسط کروموزومها و یا پلاسمیدها کد می گردند و طیف سوبسترای وسیعی دارند به طوریکه همه بتالاکتامها، به جز مونوباکتام آزترئونام را هیدرولیز می کنند. متالوبتالاکتامازها در *In vitro* توسط شلاتورهای فلزی مانند اتیلن دی آمین تتراستیک اسید، سدیم مرکاپتواستیک اسید و ۲- مرکاپتوپروپیونیک اسید مهار می گردند اما توسط مهار کننده های بتالاکتاماز نظیر سولباکتام، تازوباکتام و یا کلاولانیک اسید مهار نمی شوند. آنزیم های متالوبتالاکتاماز بر اساس ساختمان مولکولی به چهار گروه با نام های IMP, VIM, SPM, GIM تقسیم می شوند. (۹،۱۰،۱۱). در تحقیق حاضر فراوانی تولید متالوبتالاکتاماز در سویه های سودوموناس آئروژینوزا مقاوم به ایمیپنم توسط روش Etest MBL ارزیابی شد. همچنین از روش مولکولی PCR برای تایید انواع VIMو IMP متالوبتالاکتاماز استفاده گردید و شیوع این آنزیمها در ایزوله های کلینیکی سودوموناس آئروژینوزا مقاوم به ایمیپنم در طول سالها ۱۳۸٤ تا ۱۳۸۵ مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش ها :

سوشهای باکتریایی: در این تحقیق از۱۰۰ ایزوله کلینیکی سودوموناس آئروژینوزا، به دست آمده از ۱۰۰ بیمار مبتلا به عفونتهای سوختگی بستری در بیمارستان سوانح وسوختگی طالقانی اهواز، که درآزمایشگاه تعیین هویت شده بودند استفاده شد. جهت تشخیص این ایزوله ها از سایر باکتری های گرم منفی و حصول اطمینان از جنس و گونه باکتری تستهای بیوشیمیایی استاندارد انجام گرفت. این تستها شامل رشد درمحیط مک کانکی آگار، تستهای اکسیداز و کاتالاز، واکنش در محیط (Triple Sugar Iron Agar) TSI، تست OF (Oxidative- Fermentative Medium)، بررسی تحرک ، تولید اندول و گاز، رشد در ۴۲ درجه سانتی گراد و تولید پیگمان پیوسیانین در محیط مولر هینتون آگار بودند (۱۲).

تعیین حساسیت آنتی‌بیوتیکی:

الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی نمونه های کلینیکی جدا شده از بیماران سوختگی با تست دیسک دیفیوژن به روش کربی – بائر تعیین شد. آنتی بیوتیک های استفاده شده در این تحقیق شامل سفتازیدیم(CAZ)، ایمیپنم(IPM)، مروپنم(MEM)، تیکارسیلین(TIC)، پیپراسیلین(PIP) و سفپیم(FEP) بود که از کمپانی MAST از کشورانگلستان، خریداری شدند. قطر هاله‌های حاصل از این تست باید با جدول استاندارد ذکر شده که توسط شرکت MAST در اختیار قرار گرفته بود، مقایسه گردید.

Etest متالوبتالاکتاماز (Etest MBL):

در این قسمت از تحقیق سویه های تولید کننده متالوبتالاکتاماز، در ایزوله های سودوموناس آئروژینوزا مقاوم به ایمیپنم توسط نوارهای Etest متالوبتالاکتاماز(AB BIODISK, Sweden) مورد شناسائی قرار گرفتند.

جهت تهیه سوسپانسیون میکروبی ٤ تا ٥ کلنی خالص باکتری را به لوله حاوی محیط Tripticase Soy Broth (TSB) منتقل کرده و سپس آن را به مدت ۸-۲ ساعت در دمای ۳۷°C قرار دادیم تا باکتری ها رشد کرده و به فاز لگاریتمی برسند سپس کدورت محیط مایع میکروبی با استاندارد ۰/۵ مک فارلند مقایسه شد و توسط سواب استریل ازاین سوسپانسیون میکروبی استاندارد درسطح محیط مولر هینتون آگار به روش سفره ای کشت داده شد و پس ازحدود ۱۵ دقیقه و حصول اطمینان از خشک شدن سطح محیط کشت یک نوار Etest MBL در سطح آگار قرار داده و پلیتها در۳۷°C به مدت ١٦ تا ١٨ ساعت انکوبه گردیدند.

زمانیکه رشد باکتریایی به طور واضحی در روی پلیت نمایان گـردد، خواندن MIC(Minimum Inhibitory Concentration) IP و IPI ارزش دارد. در جائیکه هاله عدم رشـد مربوطـه اسـتریپ را قطع کرده است، عدد روبروی محل تقاطع منطقه عدم رشد بـا نـوار بعنوان MIC در نظر گرفته می‌شود. در تفسیر Etest MBL اگـر نسبت IP MIC به IPI بزرگتر یا مـساوی ۸ شـود بیـانگر تولیـد متالوبتالاکتاماز می‌باشد و هـمـچنـین اگـر یک ناحیه اضافی بـه نـام (phantom zone) بین قسمت های IPI وIP مشاهده شود و یا هاله عدم رشد IP یا IPI در انتهای باریـک شـونده بیـضی مهـاری دچار تغییر شکل گردند بدون در نظر گـرفتن نـسبت IP MIC بـه IPI تولید کننده متالوبتالاکتاماز تلقی می گردند (۵).

تعیین ژن متالوبتالاکتاماز:

جهـت اسـتخراج DNA بـاکتری (کرومـوزومی و پلاسـمیدی)، از روش جوشانیدن ساده(boiling) استفاده شد. ابتدا ۲ تـا ۳ کلنـی از محیط کشت برداشت نمـوده و در ۵۰۰µl آب مقطـر اسـتریل درون میکروتیوپهای اپندروف حل کرده و پس از ورتکس نمودن، محلول حاصل را به مدت ۱۰ دقیقه در بـن مـاری جـوش قـرار داده و در خاتمه میکروتیوپها را به مدت ۱۰ دقیقه در دور ۱۲۰۰۰g میکروفیوژ نموده و از محلول رویـی آنهـا بـرای انجـام تـست PCR اسـتفاده گردیـد(۹).جهـت تکثیـر DNA اسـتخراج شـده بـا اسـتفاده از واکنش PCR ، ترکیب مخلوط اصـلی بـا حجـم ۲۵ میکرولیتـر بـه ترتیب زیر بود:

بافرPCR۲/۵ میکرولیتر، مخلـوطdNTP ۰/۶۲۵میکرولیتـر، کلریـد منیزیـوم ۵۰ میلـی مـولار ۰/۷۵میکرولیتـر، آنـزیمTaq پلیمـراز ۰/۴میکرولیتر، ۰/۵میکرولیتر از هر پرایمر، DNAالگو ۵ میکرولیتر و آب مقطر ۱۴/۷۳میکرولیتر.

برنامه PCR برای ۳۰ سیکل تکثیربه دستگاه ترموسیکلر (BioRad, Italy)داده شدکه شامل مراحل زیر بود(۱۰).

مرحله اولیه جداسازی یا باز شدن دو رشته به مدت ۵ دقیقـه در ۹۴ درجه سانتی‌گراد، مرحله باز شدن دو رشته به مدت ۱ دقیقـه در ۹۴ درجه سانتی‌گراد(Denaturing Step) ،مرحله اتصال پرایمرها بـه مـدت ۱ دقیقـه در ۵۴ درجـه سـانتی‌گـراد (Annealing Step)و مرحله طویل شدن یا ساخته شدن رشته هدف به مدت ۱/۵ دقیقه در ۷۲ درجه سانتی‌گراد(Extension Step). محصولاتPCR توسط الکتروفورز با ژل آگاروز۱/۵ درصد در بافرTBE بررسی گردیدنـد. ژلها با اتیدیوم بروماید رنگ‌آمیزی شدندو سپس محصولاتPCR با نـورUV مـشاهده گردیدنـد. در ایـن تحقیـق از دو سـری پرایمـر اختـصاصی، مربـوط بـه دو ژن bla_{IMP} وbla_{VIM} متالوبتالاکتامـاز سودوموناس آئروژینوزا به شرح زیر استفاده گردید(۹). پرایمرها از شرکت Roche ،آلمان، خریداری شدند. لازم به ذکـر مـی‌باشـد در این تحقیق از سویه سودوموناس آئروژینوزا متالوبتالاکتاماز مثبت که از دانشگاه تربیت مدرس تهیه گردید به عنوان کنترل مثبت اسـتفاده شد و در قسمت PCR از آب مقطر به عنوان کنترل منفـی اسـتفاده گردید.

P. aeruginosa bla IMP primers (587bp)

1) 5´- GAAGGCGTTTATGTTCAT AC -3´
2) 5´- GTATGTTTCAAGAGTGAT GC -3´

P.aeruginosa bla VIM primers (382bp):

1)5´- GTTTGGTCGCATATCGCA AC -3´
2)5´- AATGCGCAGCACCAGGAT AG -3´

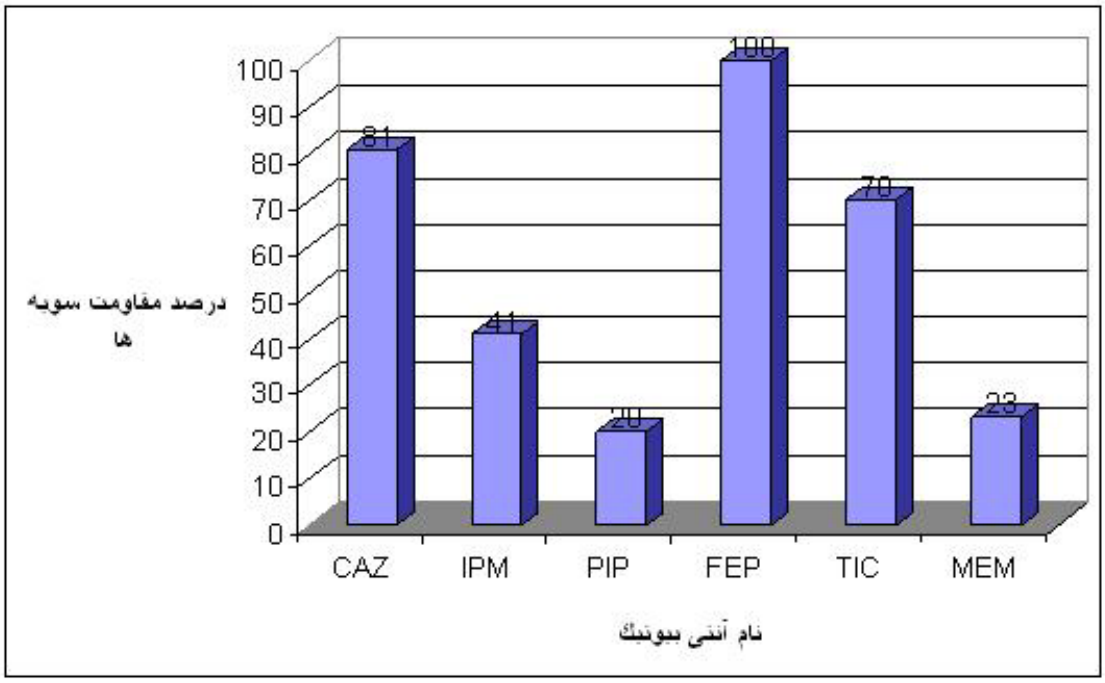
یافته ها:

نتایج حاصل از آنتی بیـوگرام بـه روش کربـی – بـائر بـرروی ۱۰۰ ایـزولـه سـودومـوناس آئروژینـوزا جـدا شـده از بیمـاران دارای عفونت های سوختگی از قرار زیر بـود:۲۰٪ ایزولـه هـا مقـاوم بـه پیپراسیلین (PIP)،۲۳٪ مقاوم به مـروپنم (MEM)، ۴۱٪مقـاوم بـه ایمیپنم(IPM)، ۷۰٪ مقاوم به تیکارسیلین (TIC)، ۸۱ ٪ مقـاوم بـه سـفتا زیـدیم (CAZ) و۱۰۰ ٪ مقـاوم بـه سـفپیم (FEP) بودنـد. (نمودار۱).

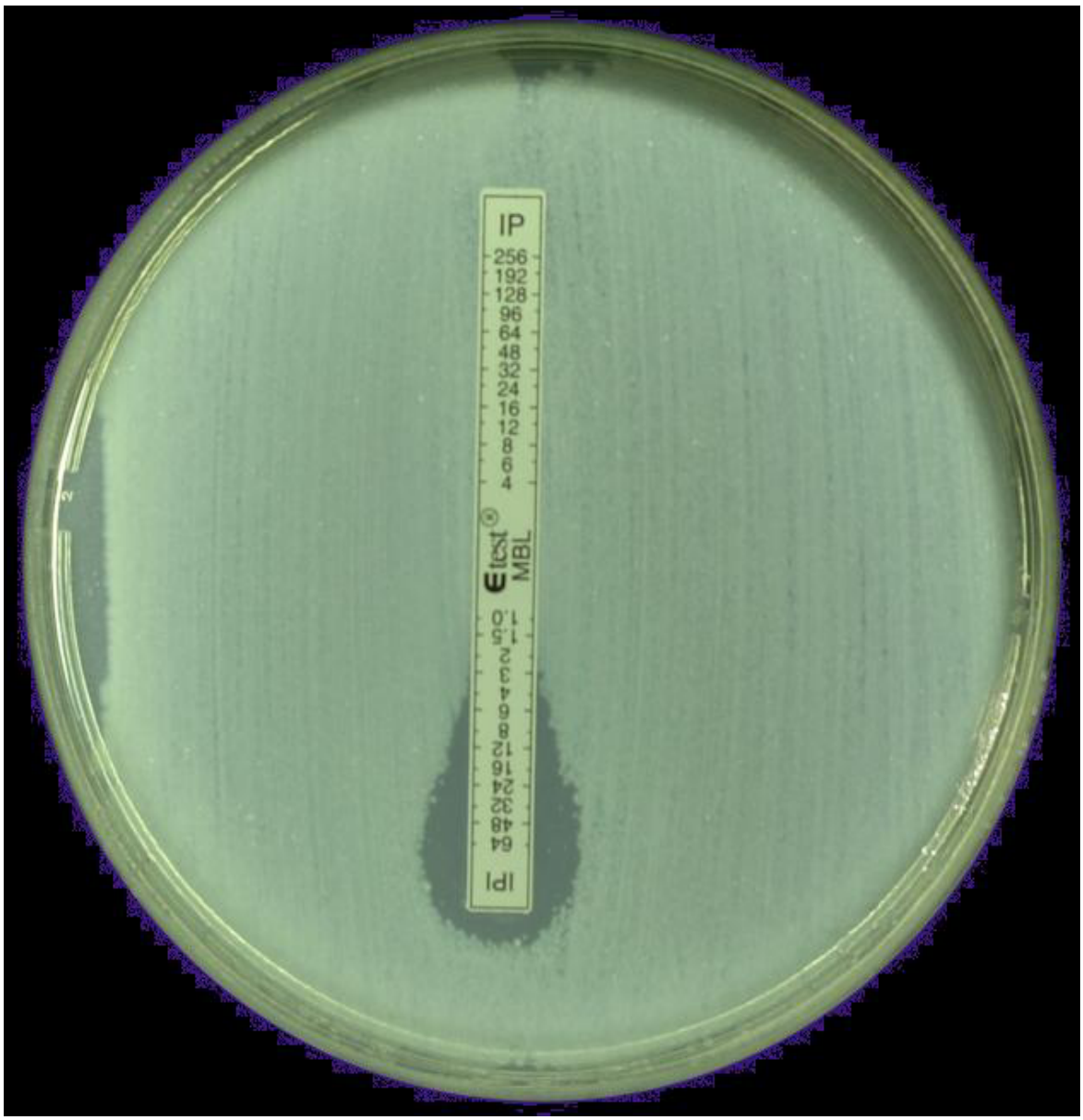
در غربالگری برای تولید متالوبتالاکتاماز درایزوله های سـودوموناس آئروژینـوزا مقـاوم بـه ایمیپـنم توسـط روش Etest MBL از ۴۱ ایـزولـه مـقـاوم، ۸ ایزوله(۱۹/۵۱٪) مثبت شـدند. بیـشترین تعـداد ایزوله های مقاوم به ایمیپـنم (۴۸/۷۸درصـد) دارای الگـوی مـشابه شش مقاومتی بودند(شکل ۱).

تمام ایزوله های کلینیکی سودوموناس آئروژینوزا مقاوم به ایمیپـنم توسط PCR، با اسـتفاده از پرایمرهـای اختـصاصی، بـرای وجـود ژنهـای VIMو IMP متالوبتالاکتامازتـست شـدند .از ۴۱ سـویه سودوموناس آئروژینوزا مقاوم بـه ایمیپـنم کـه در طـول ایـن دوره تحقیق جداسازی گردیدنـد ، ۸ ایزولـه ای (۱۹/۵۱٪) کـه بـا روش Etest MBL مثبت شدند با آزمایش PCR نیز بـرای ژن bla_{VIM} با استفاده از پرایمرهای اختصاصی آن مثبت بودند و ایزولـه ای کـه دارای ژن bla_{IMP} باشـد شناسـایی نـشد. ۳۳ ایزولـه باقیمانـده (۸۰/۴۹٪) برای هر دو ژنهای VIMو IMP متالوبتالاکتامـاز منفـی بودند(شکل ۲)

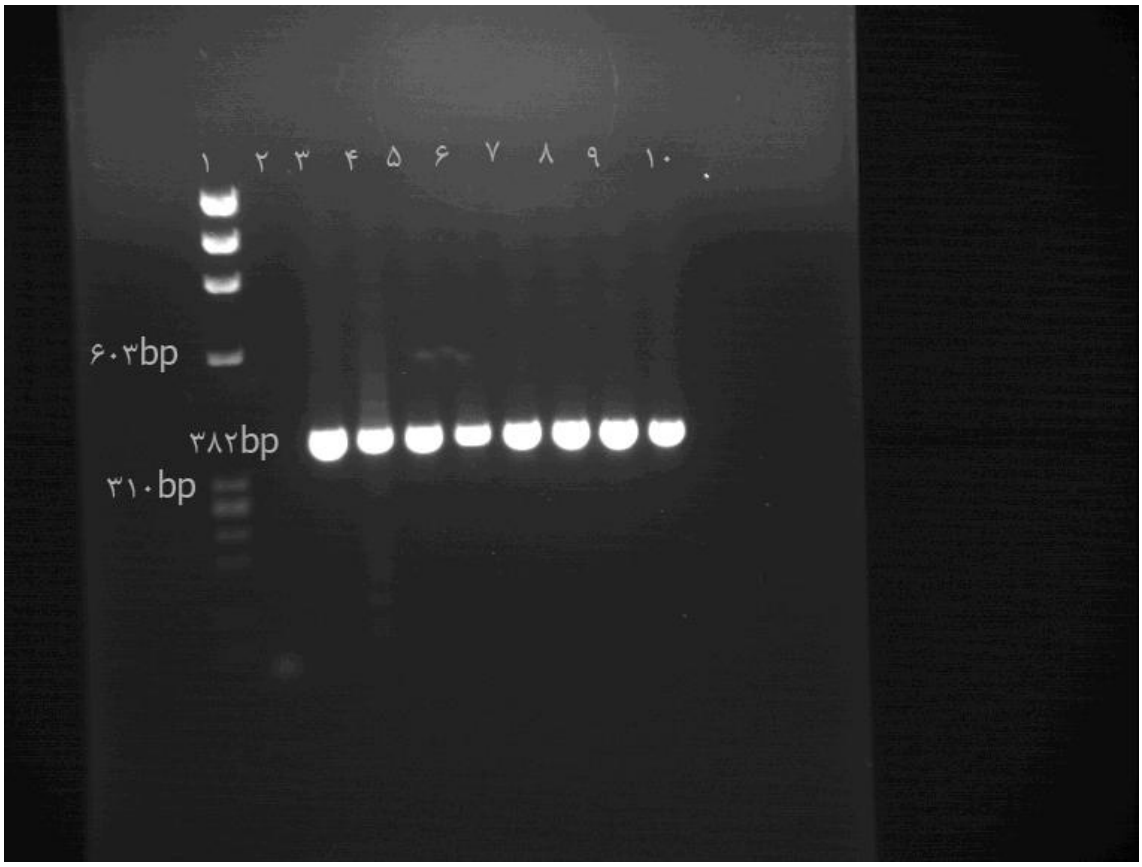
نمودار۱. درصد مقاومت سویه‌های سودوموناس آئروژینوزا جدا شده ازعفونتهای سوختگی را نسبت به آنتی بیوتیکهای استفاده شده



شکل۱.نوار Etest MBL برای تعیین ایزوله های تولید کننده متالوبتالاکتاماز



شکل۲. ژل حاوی نمونه های PCR شده



بحث:

سوشهای سودوموناس آئروژینوزا تولید کننده متالوبتالاکتاماز یک تهدید کلینیکی جدی می‌باشند که موجب نگرانی پزشکان درمان کننده عفونتهای ایجادشده توسط این باکتریها گردیده است. IMP-1 اولین متالوبتالاکتاماز شناخته شده در سودوموناس آئروژینوزا می باشد و به دلیل خطر بالقوه گسترش سریع IMP به دیگر گونه های باکتریایی نگرانی بزرگی را به وجود آورده است. متالوبتالاکتامازها از ایزوله های کلینیکی، در نقاط مختلف جهان و با شیوع در حال افزایش، در طی سالهای گذشته شناسایی شده اند و سویه‌های تولید کننده این آنزیمها مسئول عفونتهای بیمارستانی طولانی مدت همراه با عواقب جدی هستند. یک ایزوله تولید کننده متالوبتالاکتاماز در محیط بیمارستان باعث مشکلاتی در درمان بیماران می گردد و به همین دلیل یک نگرانی جدی برای شخص کنترل کننده عفونت بخصوص در واحدهای سوختگی می باشد. در مطالعه ای که در ژاپن صورت گرفته، نشان داده شده است که بیماران عفونی شده با سودوموناس آئروژینوزا تولید کننده متالوبتالاکتاماز جهت درمان آنتی بیوتیکهای مختلف دریافت می کنند و همچنین مرگ و میر ناشی از عفونت توسط این نوع باکتریها بیشتر از آنچه توسط سودوموناس آئروژینوزا متالوبتالاکتاماز منفی رخ می دهد، می باشد(۹). با توجه به اینکه سودوموناس آئروژینوزا یک پاتوژن فرصت طلب در بیماران با نقص سیستم ایمنی می باشد و عامل مهم عفونتهای بیمارستانی و سوختگی محسوب می گردد، بنابراین تعیین دقیق وگزارش سریع چنین آنزیمهایی هم از لحاظ اپیدمیولوژیک وهم به منظور کمک به پزشک در انتخاب آنتی بیوتیک مناسب جهت درمان موفق بیماران، کنترل کردن گسترش ایزوله های مقاوم به چند دارو و جلوگیری از انتشار چنین

عفونتهایی در بیمارستانها، ارزشمند خواهد بود با شیوع در حال افزایش باسیلهای گرم منفی تولید کننده متالوبتالاکتاماز در بسیاری از کشورها، تستهای ساده و دقیق برای شناسایی سویه‌های تولید کننده این آنزیمها لازم هستند. نوارهای Etest MBL بر اساس ترکیبی از یک سوبسترا بتالاکتام و یک بتالاکتام با مهار کننده متالوبتالاکتاماز برای شناسایی و تعیین این آنزیمها، طراحی شده اند. این نوارها توانایی تعیین کردن متالوبتالاکتاماز، هم کروموزومی و هم پلاسمیدی، را در باکتریهای هوازی و بیهوازی دارا می‌باشند. همه آزمایشگاههای میکروبیولوژی باید به طور روتین تولید کننده های MBL را تعیین نمایند و روش Etest MBL می تواند به این منظور استفاده شود(۵).

در این مطالعه نیز سویه‌های تولید کننده متالوبتالاکتاماز با روشEtest MBL تعیین شدند. سویه‌های مثبت به سفتازیدیم، سفپیم وتیکارسیلین نیز مقاومت نشان دادند اما سطح مقاومتشان به مروپنم و پیپراسیلین متفاوت بود.

تایید با روش PCR برای وجود ژنهای متالوبتالاکتاماز یک مرحله مهم می باشد(۹). در این تحقیق ما همچنین از آزمون PCR برای تایید سودوموناس آئروژینوزا تولید کنندهMBL استفاده نمودیم. پرایمرهای طراحی شده برای تعیین ژنهای VIMوIMP متالوبتالاکتاماز، به منظور حساسیت و ویژگی آنها، با استفاده ازDNA الگو تهیه شده از سویه کنترل مثبت آزمایش شدند و آزمون PCR نتایج روش Etest MBL را تایید نمود

در مطالعه ای که توسط Park و همکاران در سال ۲۰۰۳ در کره انجام گرفت از ۹۹ ایزوله کلینیکی سودوموناس آئروژینوزا مقاوم به ایمیپنم، ۳۱ ایزوله با روشهای فنوتیپی متالوبتالاکتاماز مثبت بودند در حالیکه با روش PCR، ۲۹ ایزوله ژنVIM و ۲ ایزوله دیگر ژنIMP را داشتند. این محققین گزارش کردند کهVIM یک متالوبتالاکتاماز مهم در سودوموناس آئروژینوزا در بیمارستانهای کره می باشد(۱۳).

درمطالعه ای که توسطLuzzaro و همکاران در سال ۲۰۰۴ در ایتالیا انجام شد، نشان دادند که از ۸۲ سویه سودوموناس آئروژینوزا مقاوم به ایمیپنم ٤ سویه با روش Etest MBL و PCR متالوبتالاکتاماز مثبت بودند و نتایج PCR آشکار کرد که هر ٤ سویه ژن VIM را داشتند این محققین بیان کردند که سویه‌های سودوموناس آئروژینوزا تولید کننده متالوبتالاکتاماز، موارد مهمی از سویه‌های مقاوم به ایمیپنم در بین گونه های جداشده از بیماران می‌باشند(١٤).

در مطالعه دیگری که توسط Kim و همکاران در طول سالهای۲۰۰۵ صورت گرفت از ۱۱٦ ایزوله کلینیکی سودوموناس آئروژینوزا مقاوم به ایمیپنم، ۲۲ ایزوله با روشEtest MBL متالوبتالاکتاماز مثبت بودند در حالیکه با روش PCR، ۲۱ ایزوله ژن VIM را داشتند و یک ایزوله باقیمانده از نظر ساختمان مولکولی کلاس بندی نشد(۱۵).

نتیجه گیری :

همه آزمایشگاههای میکروب‌شناسی باید قادر باشند سویه های سودوموناس آئروژینوزا تولید کننده متالوبتالاکتاماز را از سویه هایی که از مکانیزمهای دیگری برای مقاومت به کاربابنمها استفاده می کنند تشخیص دهند.شناسایی و تعیین اولیه سودوموناس آئروژینوزا تولید کنندهMBLs ممکن است از گسترش سویه‌های مقاوم به چند دارو جلوگیری نماید. در غیاب عوامل جدید برای درمان عفونتهای ایجاد شده توسط باکتریهای گرم منفی مقاوم به داروهای متعدد، در آینده نزدیک گسترش کنترل نشده تولید کننده های متالوبتالاکتاماز ممکن است به شکست درمان و در نتیجه افزایش عفونت و مرگ و میر منتهی گردد. بنابراین لازم است همه ایزوله های سودوموناس آئروژینوزای مقاوم یا غیر حساس به ایمیپنم، به طور روتین برای تولید متالوبتالاکتاماز با استفاده از روشهای موجود غربالگری شوند.

تقدیر و تشکر:

این تحقیق بااستفاده از بودجه طرح های تحقیقاتی معاونت پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی جندی شاپور انجام گرفته که مولفین مراتب سپاس خود را اعلام می دارند. با تشکر فراوان از پرسنل محترم آزمایشگاه بیمارستان طالقانی اهواز که در تهیه نمونه مارا یاری دادند.

فهرست مراجع:

1. Brooks GF, Butel JS, Morse SA. Jawetz, Melnick and Adelberg's Medical Microbiology. London: Lang Basic Science . 2004; pp: 262-267.
2. Aoki S, Hirakata Y, Kondoh A, Gondoh N, Yanagihara K, Miyazaki Y, *et al*. Virulence of metallo beta lactamase producing *Pseudomonas aeruginosa In vitro*. Antimicrob. *Agents Chemother* 2004; **48**: 1876-1878.
3. 3.Lee K, Lim YS, Yong D, Yum JH, Chong Y. Evaluation of the hodge test and imipenem-EDTA double disk synergy test for differentiating metallo beta lactamase producing isolates of Pseudomonas spp and Acinetobacter spp. *J Clin Microbiol* 2003; **41**:4623-4629.
4. Senda K, Arakawa Y, Lchiyama S, Nakashima K, Ito H, Ohsuka S,*et al*.PCR detection of metallo beta lactamase gene(blaIMP) in gram negative rods resistant to broad spectrum beta lactams. *J Clin Microbiol* 1996; **34**: 2909-2913.
5. Walsh TR, Bolmstrom A, Qwarnstrom A, Gales A. Evaluation of a new Etest for detection metallo beta lactamases in routine clinical testing. *J Clin Microbiol* 2002; **40**: 2755-2759.
6. Senda K, Arakawa Y, Nakashima K, Ito H, Ichiyama S, Shimokata K, *et al*. Multifocal outbreaks of metallo beta lactamase producing *Pseudomonas aeruginosa* resistant to broad spectrum beta lactams including carbapenems. *Antimicrob Agents Chemother* 1996; **40**:349-353.
7. Mendiratta DK, Deotale V, Narang P. Metallo beta lactamase producing *Pseudomonas aeruginosa* in a hospital from a rural area. *Indian J Med Res* 2005; **121**: 701-703.
8. Henrichfreise B, Wiegand L, Sherwood KJ, Wiedemann B. Detection of VIM-2 metallo beta lactamase in *Pseudomonas aeruginosa* from Germany. *Antimicrob Agents Chemother* 2005; **49**: 1668-1669.
9. Pitout JDD, Gregson DB, Poirel L, McClure JA, Le P, Church DL. Detection of *Pseudomonas aeruginosa* producing metallo beta lactamases in a large centralized labratory. *J Clin Microbiol* 2005; **43**: 3129-3135.
10. Helfand MS, Bonomo RA. Current challenges in antimicrobial chemotherapy: the impact of extended-spectrum beta lactamases and metallo beta lactamases on the treatment of resistant Gram-negative pathogens. *Curr Opin Pharmacology* 2005; **5**: 452-458.
11. Arakawa Y, Shibata N, Shibayama K, Yugi T, Fujiwara H, *et al*. Convenient test for screening metallo beta lactamases producing gram negative bacteria by using thiol compounds. *J Clin Microbiol* 2000; **38**: 40-43.
12. Forbes BA, Sahm DF, Weissfeld AS. Diagnostic Microbiology. 11th ed. Missouri: Mosby company. 2002; pp: 389-391.
13. Park JJ, Oh EJ, Lee S, Kim SI, Park YJ, Kang MW and *et al*. Prevalence of metallo beta lactamase among *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannnii* in a Korean university hospital and comparison of screening methods for detecting metallo beta

lactamase. *J Microbiol Methods* 2003; **54**:411-418.

14. Luzzaro F, Endimiani A, Docquier JD, Mugnaioli C, Bonsignori M, Amicosante G, *et al*. Prevalence and characterization of metallo-beta-Lactamases in clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. Diagn. *Microbiol Infect Dis* 2004; **48**:131-135.
15. Kim IS, Lee NY, Ki CS, Oh WS, Peck KR, Song JH. Increasing prevalence of imipenem-resistant Pseudomonas aeruginosa and molecular typing of metallo-beta-lactamase producers in a Korean hospital. *Microb Drug Resist* 2005; **11**: 355-359.

مجله میکروب شناسی پزشکی ایران

سال ۱ شماره ۱ بهار ۱۳۸۶، صفحات ۳۳ – ۳۸

بررسی وجود ژن *aac(6')-le-aph(2")-la* در سویه های انتروکوکوس فکالیس و انتروکوکوس فیسیوم چند مقاومتی و مقاوم به مقادیر بالای جنتامایسین

مهناز سیفی[۱]، محمد رضا پورشفیع[۲]، کتایون برهانی[۲]، فاتح رحیمی[۲]، محمد مهدی سلطان دلال*[۱]

۱) بخش باکتری شناسی، گروه پاتوبیولوژی، دانشکده بهداشت دانشگاه تهران

۲) بخش باکتری شناسی، انستیتو پاستور ایران

نویسنده رابط: محمد مهدی سلطان دلال، بخش باکتری شناسی، گروه پاتوبیولوژی، دانشکده بهداشت دانشگاه تهران

تلفن: ۰۹۱۲۱۴۵۲۶۴۶ – ۶۶۴۶۵۴۰۴ **soltanda@tums.ac.ir**

تاریخ دریافت مقاله: ۸۶/۳/۱ تاریخ پذیرش مقاله: ۸۶/۳/۲۲

چکیده:

زمینه و اهداف: انتروککها نقش مهمی را در ایجاد عفونت های بیمارستانی دارند و وجود سویه های چند مقاومتی در بین آنها، درمان این نوع عفونتها را به یک معضل بهداشتی تبدیل کرده است. انتروککها می توانند برخی ژنهای مقاومت به آمینوگلیکوزیدها را بصورت اکتسابی بدست آورند . محصول این ژنها آنزیمهایی هستند که باعث تغییر در ساختار آمینوگلیکوزیدها شده ودر نهایت این امر منجر به حذف اثر سینرژیسم باکتریسیدال خواهد شد. یکی از مهمترین ژنهای ایجاد کننده مقاومت به مقادیر بالای جنتامایسین aac(6')- le-aph(2")-la است. هدف از این مطالعه بررسی شیوع سویه های آنتروکوکوس فکالیس و آنتروکوکوس فسیوم چند مقاومتی و همچنین مقاوم به مقادیر بالای جنتامایسین در نمونه های کلینیکی با تاکید بر روی وجود ژن aac(6')-le-aph(2")-la می باشد.

روش بررسی: بدنبال کشت اولیه۴۳۷ نمونه بالینی ارجاع شده به ۵ بیمارستان و ۳ آزمایشگاه خصوصی در شهر تهران ، جمعا ۳۰۰ سویه انتروکک جداسازی گردید و پس از انجام آزمایشات بیوشیمیایی و تعیین جنس و گونه باکتری ، با استفاده از روش دیسک دیفوزیون تست سنجش حساسیت آنتی بیوتیکی برای ۱۱ آنتی بیوتیک آمپی سیلین ، تتراسیکلین ، اریترومایسین ،سیپروفلوکسازین ،جنتامایسین دوز بالا ،ونکومایسین، کوتریموکسازول،کوئینو پریستین – دالفو پریستین (سینرسید)، لینه زولید، تیکوپلانین و نیتروفورانتوئین انجام شد. مکانیزم مولکولی مقاومت به جنتامایسن با دوز بالا در دو گونه ذکر شده توسط تشخیص ژن aac(6')-le-aph(2")-la با روش PCR بررسی گردید.

یافته ها: در مجموع کل سویه های بدست آمده، درصد گونه فکالیس در مقایسه با گونه فیسیوم به ترتیب ۸۱/۳٪ و ۱۸/۷٪ بود. گونه های فیسیوم مقاومت نسبتا بالاتری به آنتی بیوتیک ها ی مورد مطالعه در مقایسه با گونه های فکالیس نشان دادند. درصد سویه های چند مقاومتی در گونه فکالیس ۵۰٪ و در گونه فیسیوم ۹۵٪ بدست آمد. این ارقام در خصوص سویه های مقاوم به مقادیر بالای جنتامایسین به ترتیب ۱۹/۵ و۲۳/۵ درصد بودند و کلیه این سویه ها دارای MICبالاتر از ۱۰۲۴ میکروگرم در میلی لیتر بودند. ۸۳ درصد از سویه های فکالیس و ۱۰۰ درصد از سویه های فیسیوم دارای ژن aac(6')-le-aph(2")-la بودند.

نتیجه گیری: با توجه به درصد بالای سویه های چند مقاومتی و HLGR در بین جمعیت انتروککی مورد مطالعه و همچنین شیوع بالای ژن aac(6')-le-aph(2")-laدر بین سویه ها ی HLGR ،نشان دهنده ارتباط قوی این ژن با ایجاد مقاومت به مقادیر بالای جنتامایسین است که این خود بیانگر این نگرانی است که چنانچه در طول زمان، انتقال این ژن به سویه های حساس به جنتامایسین با روندی فزاینده اتفاق بیفتد، با مشکلات اساسی در درمان این نوع عفونتها مواجه خواهیم شد و این قضیه در دراز مدت نیاز به پیدایش نسل های تازه از آمینوگلیکوزیدها ویا آنتی بیوتیکهای جدید را می طلبد.

کلید واژه ها: انتروکوکوس، چند مقاومتی، مقاوم به مقادیر بالای جنتامایسین

مقدمه:

انتروکک ها جزء پاتوژنهای بسیار مهم در عفونت های بیمارستانی هستند . منبع اصلی این عفونت ها اغلب فلور نرمال گوارشی افراد است. طبق آمارهای موجود انتروکوکوس فکالیس و انتروکوکوس فیسیوم به ترتیب مسئول ۹۰ و ۱۰-۵ درصد از عفونت های انتروککی هستند(۱). مشخص شده انتروککها توانایی بسیار بالایی برای کسب مقاومت های آنتی بیوتیکی جدید داشته و انتقال دهندگان مهمی نیز در مورد انواع ژنهای مقاومت به آنتی بیوتیک ها به حساب می آیند. این گروه از باکتریها در حال افزایش مقاومت به سه گروه دارویی موثر در درمان عفونت های انتروککی یعنی پنی سیلین ها ،آمینو گلیکوزیدها و گلیکو پپتیدها هستند(۳و۲) . انتروکک ها بدلیل نقص در ترانسپورت فعال از غشای سیتوپلاسمی ، بصورت ذاتی به مقادیر پایین آمینوگلیکوزیدها مقاوم بوده و به همین علت به تنهایی در درمان عفونت های انتروککی ناکافی هستند ولی در ترکیب با ممانعت کننده های سنتز سل وال که ورود آنها را به سلول تسهیل می کند از موثرترین درمانهای رایج میباشند(۴). متاسفانه این اثر سینرژیسم وقتی انتروککها مقاومت به مقادیر بالای جنتامایسین۵۱۲ <MIC راکسب کنند وجود ندارد(۳). این مسئله خطر جدی را در درمان عفونت های انتروککی مطرح ساخته است. مکانیزم اصلی در ایجاد مقاومت به آمینوگلیکوزیدها ،غیرفعال شدن دارو توسط آنزیمهای ترشحی از باکتری است که توسط ژنهای خاصی کد می شوند. در انتروککها ژن aac(6')-le-aph(2")-la نقش اصلی را در پیدایش مقاومت نسبت به دوز بالای جنتامایسین دارد ولی در سالهای اخیر نقش چند ژن دیگر نیز در این قضیه مشخص شده است(۵). ژن-aac(6')-le-aph(2")-la در اکثریت سویه های مقاوم به جنتامایسین پلاسمیدی است و بر روی ترانسپوزون Tn 4001 استافیلوککی قرار دارد(۶).

مواد و روش ها:

جداسازی و تشخیص باکتری :از۴۳۷ نمونه ارجاع شده به ۵ بیمارستان و ۳ آزمایشگاه خصوصی در تهران از آذر ماه ۱۳۸۴ الی تیر ماه ۱۳۸۵ ، در مجموع ۳۰۰ سویه انتروکک جداسازی گردید. نمونه ها شامل ادرار ، زخم، خون ، مجرا ،آبسه،لاواژ ریه و مایع مفصل بودند.

جداسازی سویه ها بااستفاده از محیط کشت بلاد آگار وتشخیص فنوتیپی آنها با بکارگیری تستهای کاتالاز، PYR ، هیدرولیزبایل اسکولین، رشد برروی محیط نمک ۶/۵٪ و تخمیر قندها با استفاده از استانداردهای بین المللی بود.

تست سنجش حساسیت آنتی بیوتیکی : با استفاده از جداول CLSI وبرای ۱۱ آنتی بیوتیک آمپی سیلین، تتراسیکلین، اریترومایسین، سیپروفلوکسازین، جنتامایسین دوز بالا، ونکومایسین، کوتریموکسازول، کوئینو پریستین – دالفو پریستین (سینرسید)، لینه زولید، تیکوپلانین و نیتروفورانتوئین و بر روی محیط مولر هینتون آگار انجام شد . کنترل کیفی دیسکهای آنتی بیوگرام با استفاده از سویه های استاندارد استافیلوکوکوس ارئوس ۲۵۹۲۳ و انتروکوکوس فکالیس ۲۹۲۱۲ انجام گرفت.

MIC سویه ها

برای سویه هایی که در روش دیسک دیفوزیون مقاوم به دیسک جنتامایسین ۱۲۰ میکروگرم بودند ،MIC به روش microdilution بر اساس استاندارد CLSI انجام شد.

تشخیص ژن aac(6')-le-aph(2")-la توسط روش PCR جهت تهیه DNA ژنومیک باکتری با استفاده از پروتکل انستیتو پاستور پاریس(۷)، چند کلنی از آن بر روی ۱۰ میلی لیتر محیط BHI مایع کشت داده میشد. پس از ۲۴ ساعت انکوباسیون در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد از ۳ میلی لیتر این کشت توسط سانتریفیوژ در ۴۰۰۰rpm بمدت ۲۰ دقیقه رسوب گیری به عمل می آمد. سپس به رسوب ۱۰ میلی مولار تریس –HCl، ۱ میلی مولار EDTA ، ۵۰٪ سوکروز ، ۲۰ میلی گرم در میلی لیتر لیزوزیم و ۱۰ درصد SDS افزوده وبا شیکر بخوبی مخلوط نموده، ۱۰ دقیقه روی یخ قرار می دهیم. پس از آن ۲۰ دقیقه در rpm ۴۰۰۰ سانتریفیوژ نموده ، مایع رویی را برداشته و با افزودن مخلوط فنل و کلروفرم DNA را استخراج می کنیم. یک میکرولیتر از این DNA برای واکنش PCR کافی است. سکانس پرایمر های مورد استفاده در واکنش PCR برای تشخیص وجود ژن aac(6')-le-aph(2")-la ، شامل CCTCGTGTAATTCATGTTCTGGC و CAGAGCCTTGGGAAGATGAAG و محصول نهایی تکثیر، با حضور قطعه ای با وزن مولکولی ۳۴۸bp نشان دهنده وجود این ژن بود (۵).

واکنش PCR در حجم نهایی ۲۵ میکرولیترانجام میشد و ترکیب آن شامل ۲/۵ پیکومول از هر پرایمر ، ۱/۵ میلی مول MgCl2 ، ۰/۴ میلی مول از dNTP ، ۲/۵ میکرولیتر بافرو ۲ واحد از آنزیم Taq polymerase

بود. سویه استاندارد JH2-102/ p1P800+plP802 نیز بعنوان کنترل مثبت در این واکنش ها استفاده میشد.سیکل واکنش زنجیره پلیمراز،از دناتوراسیون در دمای ۹۴ درجه سانتیگراد به مدت ۳ دقیقه شروع شده وبه تعداد ۳۵ سیکل به شرح زیر ادامه مییافت. ۹۴ درجه ۴۰ ثانیه،۵۵ درجه ۴۰ ثانیه و ۷۲ درجه ۴۰ ثانیه و در نهایت با ۷۲ درجه بمدت ۲ دقیقه پایان می یافت(۵).محصول PCR با وزن ۳۴۸bp بر روی آگاز ۱/۵ ٪در مقابل مارکر وزن مولکولی DNA ladder مورد

الکتروفورز قرار میگرفت.و ژل آگارز بااتیدیوم بروماید رنگ آمیزی شدهو قطعات DNA بااستفاده از نور UV رویت میشدند.

یافته ها:

از کل نمونه های بالینی مورد مطالعه، ادرار درصدغالب وپس از آن زخم وخون و سایر نمونه ها درصد های پایین تری را به خود اختصاص دادند.(جدول ۱).

از بین سویه های جداشده۸۱/۳٪ (۲۴۷ مورد) به گونه فکالیس و ۱۸/۷٪(۵۳مورد) به گونه فیسیوم اختصاص داشت. درصد سویه های MDR و HLGR در خصوص گونه فکالیس به ترتیب ۵۰٪ (۱۲۴ مورد) و۱۹/۵٪ (۴۸ مورد) ودر مورد گونه های فیسیوم به ترتیب ۹۵٪(۵۰ مورد) و ۲۳/۵٪ (۱۳ مورد) بود.(جدول ۲).

بررسی مقاومت به ۱۱ نوع آنتی بیوتیک مختلف از جمله دو داروی جدید لینه زولید و کوئینو پریستین –دالفوپزیستین (سینرسید) نشان داد که مقاومت آنتی بیوتیکی در بین سویه های فیسیوم بالاتر از موارد مشابه در گونه فکالیس است. در گونه فکالیس مقاومت بین ۶۰—۱۹/۵درصد به ترتیب نسبت به جنتامایسین، سیپروفلوکسازین ، کوتریموکسازول ،اریترومایسین وتتراسیکلین وجود داشت. درحالیکه در گونه فیسیوم مقاومت بین ۱۳/۵-۲۳/۵ درصد به ترتیب نسبت به کوتریموکسازول، آمپی سیلین،سیپروفلوکسازین ،اریترومایسین،ونکومایسین و جنتامایسین بود. مقاومت نسبت به دو داروی جدید سینرسید و لینه زولید در گونه فکالیس به ترتیب ۱۰۰ و۲/۵ درصد و در گونه فیسیوم به ترتیب ۱و صفر درصد بود.(جدول ۳)

در آزمایش PCR برای تشخیص ژن aac(6')-le-aph(2")-la از کل سویه های HLGR در گونه فکالیس ۸۳٪ و در گونه فیسیوم ۱۰۰٪ این ژن را داشتند.

جدول ۱: انواع نمونه های بالینی مورد مطالعه

نوع نمونه	تعداد(%)
ادرار	۲۸۶ (۹۵/۴)
زخم	۵ (۱/۶)
خون	۴(۱/۵)
مجرا	۲ (۰/۶)
آبسه	۱ (۰/۳)
لاواژ ریه	۱ (۰/۳)
مایع مفصل	۱ (۰/۳)

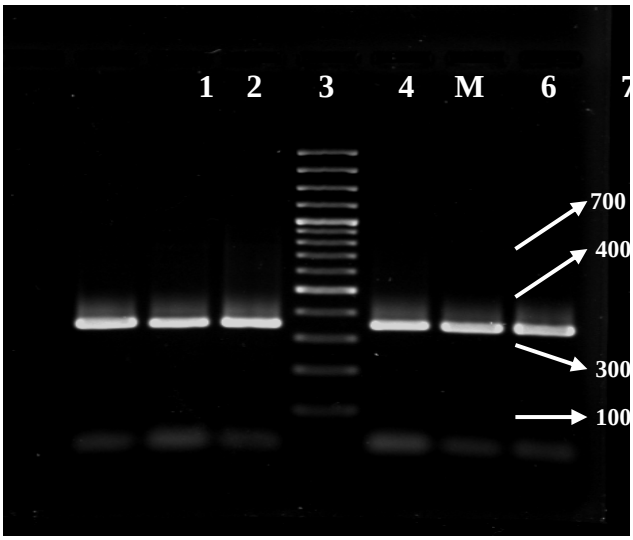
جدول ۲: درصد مقاومت به انواع آنتی بیوتیکها در دو گونه

نوع آنتي بيوتيك (ميكروگرم)	انتروکوکوس فکالیس (%)	انتروکوکوس فیسیوم (%)
آمپي سيلين ۱۰	۱/۳	۱۵
تتراسيكلين ۳۰	۶۰	۹/۵
اريترومايسين ۱۵	۳۶/۵	۱۶/۵
سيپروفلوكسازين ۵	۲۴/۵	۱۶
جنتامايسين ۱۲۰	۱۹/۵	۲۳/۵
ونكومايسين ۳۰	۷/۵	۲۱/۵
كوتريموكسازول ۱/۲۵ - ۲۳/۷۵	۳۰/۵	۱۳/۵
سينرسيد ۱۵	۱۰۰	۱
لينه زوليد ۳۰	۲/۵	صفر
تيكوپلانين ۳۰	۵/۵	۱۴
نيتروفورانتوئين ۳۰۰	۰/۵	۲

جدول ۳ : درصد سویه های MDR و HLGR در بین دو گونه انتروککی

گروه	انتروکوکوس فکالیس (%)	انتروکوکوس فیسیوم (%)
کل	۲۴۷ (۸۱/۳)	۵۳ (۱۸/۷)
چند مقاومتي ها (MDR)	۱۲۴ (۵۰)	۵۰ (۹۵)
مقاوم به جنتامایسین دوز بالا(HLGR)	۵۹ (۱۹/۵)	۷۰ (۲۳/۵)

عکس ۱ : PCR جهت ژن aac(6')-le-aph(2")-la



بحث:

برای سیستم مراقبت بهداشتی هر جامعه بسیار لازم وضروری است تا عوامل مهم و شایع پاتوژنهای بیمارستانی را شناسایی نموده و الگوی دقیق مقاومت آنتی بیوتیکی آنها را مشخص نمایند تا بتوانند درمان موثری را جهت کنترل آنها بکار گیرند.(۸)

تا چندی قبل آمپی سیلین همراه با جنتامایسین یا استرپتومایسین بعنوان اولین داروهای انتخابی در درمان عفونت های حاد انتروککی بشمار می رفتند ولی از زمانیکه سویه های مقاوم به هر کدام از این داروها شیوع بالایی پیدا کرده اند اثر سینرژیسم درمانی آنها خنثی شده و درمان آنتی بیوتیکی با مشکلات فراوانی مواجه شده است(۹). در این میان سویه های مقاوم به آمینو گلیکوزیدها و بخصوص جنتامایسین با دوز بالا در سالهای اخیر محور تحقیق بسیاری از محققین را به خود اختصاص داده است بدیهی است که نه تنها شناسایی ژنهای ایجاد کننده این مقاومتها نسبت به انواع آمینوگلیکوزیدها بلکه راهها و فرکانس انتقال آنها نیز مد نظر بوده است(۵).

در مطالعه حاضر اکثریت سویه های جدا شده به گونه فکالیس با ۸۱/۳٪ اختصاص داشت که در مطالعات مشابه این ارقام چندان تفاوتی را نشان نمی دهند. در مطالعه ای در برزیل اکثریت نمونه ها ۷۰/۳ ٪ از ادرار و ۲۰/۷ ٪ از سایر موارد مثل خون ء کاتتر و.... جدا شده بودند و اکثریت سویه ها با گونه فکالیس با ۹۲/۸ ٪

بود.در این مطالعه سویه های مقاوم به جنتامایسن با دوز بالا ۲۲/۸ ٪ بودند(۱۰).

محققین امریکایی در سال ۲۰۰۳ از ۳۶۰ سویه انتروکک ۲۵۹ مورد HLGR گزارش کردند که MIC آنها بین ۱۰۲۴– ۱۲۸ میکروگرم در میلی لیتر بود. ۷۵ درصداز گونه های فکالیس و ۶۳ درصد از گونه های فیسیوم دارای ژن aac(6')-le-aph(2")-la بودند (۱۱). در بررسی ما این ژن در ۱۰۰ درصد از سویه های فیسیوم و ۸۳ درصد از گونه های فکالیس دیده شد. این قضیه بیانگر جایگاه ویژه این ژن بعنوان مخزن ژن مقاومت و انتقال آن به

سایر سویه ها می باشد. بررسی راههـا و فرکـانس ایـن انتقـال نیـز بسیار مهم است.

در تحـــقیقی در ایتالیـــا از ۹۱ ســـویه انتروکـــک کلینیکـــی ۴۳٪ از فکالیس ها و ۵۲ ٪ از فیسیوم ها HLGR بودند (۱۲)و در موردی مشابه در کویت از ۱۱۷ ســویه انتروکـک ۱۰۹ ســویه فکـالیس و ۷ سویه فیسیوم و بقیه شامل گونه های دیگر بودند. در ایـن میـان ۵۵ ســویه HLGR مـشاهده شـد کـه همگـی MIC بـالای ۵۰۰ میکروگرم در میلی لیتر داشتند(۱۲).

در مطالعـه Zarrilli در سـال ۲۰۰۳ هـیچ انتروکوکـوس فیـسیوم مقاوم به آمپی سیلین گزارش نشد و این در حالی بود که ۲۲ درصد از گونه فکالیس HLGR بودند که به گفته این محقق ایـن رقـم در مطالعات مختلف بـین ۱۴-۴۱ درصـد(۱۲) و بـه گفتـه محقـق دیگـــری بـــین ۱-۴۸ درصـــد (۱۳) نوســـان دارد. مقاومـــت بـــه سیپروفلوکسازین ء تتراسیکلین و اریترومایسین در بین هر دو سویه شایع و برای تتراسیکلین و سیپروفلوکسازین به ترتیب ۹۸٪ و ۶۶٪ بوده است. در این تحقیق در مورد آمپی سیلین ۱۲ درصد مقاومـت در بین سویه های فکالیس گزارش شده است(۱۲) در حالیکه در تحقیق ما فقط ۱/۳ درصد از فکالیس ها و ۱۵ درصد از فیسیوم هـا مقاوم به آمپی سیلین بودند که کاملا متفاوت اسـت . در ایتالیـا ۱۷ درصـد از سـویه هـای فکـالیس مقـاوم بـه آمپـی سـیلین گـزارش شدند(۹).

در سالهای۱۹۸۵-۱۹۸۶ مقاومت به سیپروفلوکسازین در سویه های انتروکک بسیار محدود و حدود ۱/۴ ٪ از آنها HLGR بودند ولی این رقم در سالهای ۱۹۸۹-۱۹۹۰ افزایش یافته و به ۱۵/۲ ٪ رسـید و این بار دیگـر اغلـب ایـن سـویه هـا HLGR گـزارش شـدند. مقاومت در بین سویه های فکالیس جداشده در این مطالعه نسبت به سیپروفلوکسازین ۲۴/۵٪ و در سویه های فیسیوم ۱۶٪ بودکه سیر افزایشی موجود در مطالعه schaberg را نشان می دهد(۱۴).

در طی مطالعه ای درایتالیا در بین سویه های مقـاوم و حـساس بـه ونکومایس مقاومت به سایر آنتی بیوتیک هـا مقایـسه شـده اسـت. براین اساس در سویه های فیسیوم مقـاوم بـه ونکومایـسین درصـد مقاومـــت بـــه آمپـــی ســـیلینء جنتامایـــسینء سیپروفلوکـــسازینء تتراسیکلینء اریترو مایسین و کوتریموکسازول به ترتیب ۸۱ء ۴۰ ء ۸۱ ء ۸۷ ء ۸۷ و ۶۷ درصد و در سویه های فیـسیوم حـساس بـه ونکومایـسین بـه ترتیـب ۷۱ ء ۱۴ء ۷۱ء ۷۱ ء ۱۰۰ و ۱۰۰ درصـد بوده است که در مورد گونـه فکـالیس ایـن درصـدها همـه بـسیار پاییینتر بوده است. در این میان سویه های چند مقاومتی و مقاوم بـه ۴ آنتی بیوتیک یـا بـیش از آن حـدود ۹۰ درصـد بودنـد (۱۵). در مطالعه ما سویه های فکالیس ۷/۵ ٪ و سـویه هـای فیـسیوم ۲۱/۵٪ نسبت به ونکومایسین مقاومت داشتند و تعداد چند مقاومتی هـا در بـیـن فـیـسیومها بـیـشتر بود. همچنین درصد مقاومـت بـه سـایر آنتی بیوتیک ها نـیـز در بـیـن گونه فیسوم ارقام بـالاتری را نـشان می دهد.

در مطالعه دیگری در یونان در طی یکسال از ۵۵ گونـه فکـالیس و ۲۱ گونه فیسیوم که اکثرا از ادرار جدا شـده بودنـدءهیچ سـویه ای مقاوم به ونکومایسین گزارش نشد ولـی ۲۲ سـویه از فکـالیس هـا HLGR بـودو ژن aac(6')-le-aph(2")-la در ۱۰ سـویه از فکالیس ها مشاهده شد.(۱۶)

با افزایش تعـدد و شـیوع ژنهـای مقاومـت بـه آمینوگلیکوزیـدها و بخصوص جنتامایسین در بین ایزوله های کلینیکی ء امروزه استفاده از این داروها در درمان عفونتهای انتروککی محدود شـده اسـت و نقش داروهایی مثل سینرسید و لینه زولیـد و آمینـو گلیکوزیـدهای جدید که خوشبختانه در مطالعات مختلف هنوز مقاومت چندانی به آنها گزارش نشده است ء بسیار مطرح است.(۱۷و۱۸).

فهرست مراجع:

1 – Simonsen G.S., Smabrekke L., Monnet D.L., Sorensen T.L., Moller J.K. ,et al .Prevalence of resistance to ampicillinn, gentamicin,and vancomycin in enterococcus faecalis and enteococcus faecium isolates from clinical specimens and use of antimicrobials in five nordic ospitales. *J.Antimicro.Chemother*.2003. 51: 323-331.

2- Tankovic J., Mahjoubi F., Courvalin P., Duval J., Leclerco R. Development of fluoroquinolone resistance in Enterococcus faecalis and role of mutations in the DNA gyrase gyrA gene. *Antimicrob.Agents Chemother*.1996. 40(11):2558-61.

3- Aslangul E., Massias L., Meulemans A., Chau F., Andremont A., Courvalin P., Fantin B., Ruimy R. Acuired gentamicin resistance by permeability impairment in Enterococcus faecalis.

Antimicrob.Agents Chemother. 2006.50: 3615-21.
4- Lefort A., Arthur M., Garry L., Carbon C., CourvaliinP., Fantin B.Bactericidal activity of tgentamicin against Enterococcus faecalis in vitro and in vivo. *Antimicrob.Agents Chemother.2000.* 44(8):2077-80
5-Vakulenko S.B., Donabedin S.M., Voskersenskiy A.M., Zervos M.J., Lerner S.A., Chow J.W. Multuplex PCR for detection of aminoglycoside resistance genes in enterococcus. *Antimicrob.Agents Chemother*. 2003.47(4):1423-26
6- Daikos G., Bamias G.,Kattamis C., Zervos M.J., Chow J.W., Christakis G., et al. Structure , location and transfer frequencies of genetic elements conferring high-level gentamicin resistance in Enterococcus faecalis isoletes in Greece . *Antimicrob.Agents Chemother*.2003.47(12):3950-53.
7-Unite des Agents Antibacteriens centre National de reference des Antibiotiques –Institute pasteur –Antibiotic resistance techniques- 5th edition- 2006-102.
8- Tenover F.C., Tokars J., Swenson J., Paul S., Spitalny K., Jarvis W. Ability clinical laboratories to detect antimicrobial agent-resistant Enterococci. *J.Clin.Microbiol.*1993. 31(7): 1695-99
9-Titze-de-Almeiad R., RolloFilho M., Silveria C.A.N., Rodrigues I.P., Eudesfilho J., etal. Molecular epidemiology and antimicrobial susceptibility of Enterococci recovered from Brazillian intensive care units. *BJID* .2004.8(3): 197-205
10- Azevedo P>A., Dias C.A.G., Teixeira L.M. Genetic diversity and antimicrobial resistance of Enterococcal isolates from southern region of Brazil. *Rev.Inst. Med.Trop. S. Paulo.*2006.48(1):11-16.
11 - Donabedian S.M., Thal L.A., Hershberger E., Perri M.B., Chow J.W., etal. Molecular characterization of gentamicin –resistant Enterococci in the United states:evidence of spread from animals to human through food. *J.Clin.Microbiol*.2003.41(3):1109-13.
12- Zarrilli R., Tripodi M.F., Dipopolo A., Fortunato R., bagattini M., Crisipino M., Florio A., Triassi M., Utili R. Molecular epidemiology of high- level aminoglycoside –resistant Enterococci isolated from patients in a university hospital in southern Italy.*J.Antimicro.Chemothe*r.2005.56(5):827-3
13-Schouten M.A., Voss A., Hoogkamp-korstanje J.A.A . Antimicrobial susceptibility patterns of Enterococci causing infections in Europe. *Antimicrob.Agents Chemother.*1999. 43(10): 2542-46.
14– Schaber D.R., Dillon W.I., Terpenning M.S., Robinson K.A., Bradley S.F., Kauffman C.A. Increasing resistance of Enterrococci to ciprofloxacin. *Antimicrob.Agents Chemother*.1992. 36(11):2533-35.
15- Busani L. , Del Grosso M., Paladini C., Graziani C., Pantosti A., Biavasco F., Capriolo A. Antimicrobial susceptibility of vancomycin –susceptible and –resistant enterococci isolated in Italy from raw meat product, farm animals and human infections . *Inter.J. food.Microbiol* .2004.
16- Kapaparaskevas J., Vatopoulos A., Tassios PT., Avlami A.,Legakis N.J., Kalapothaki V. Diversity among High- level aminoglycoside-resistant Enterococci .*J.Antimicro.Chemother*. 2000.45(3):.277-83
17- Eliopoulos G.M.Aminiglycoside resistance in Enterococci. *Clin.Infec.Dis*.2000.31.586-9.
18- Schouten M.A., Voss A., Hoogkamp-korstanje J.A.A. Antimicrobial susceptiility patterns of Enterococci causing infections in Europe. *Antimicrob.Agents Chemother*.1999. 43(10): 2542-4

مجله میکروب شناسی پزشکی ایران
سال ۱ شماره ۱ بهار ۱۳۸۶، صفحات ۳۹ – ۴۵

مقایسه اثر ضد میکروبی رسپیتول B حاوی منتول و اسانس اکالیپتوس با منتوفین،منتول،اسانس اکالیپتوس

محدثه محبوبی[×]، محمد اکبری، قاسم حقی، نسترن کاظم پور

بخش تحقیق وتوسعه شرکت داروسازی باریج اسانس
نویسنده رابط : محدثه محبوبی، کاشان- کیلومتر۵ مشهد اردهال بخش تحقیق وتوسعه شرکت داروسازی باریج اسانس - صندوق پستی۱۱۷۸
تلفن : ۰۹۱۳۱۶۳۸۹۶۴ **mahboubi@barijessence.com**

تاریخ دریافت مقاله : ۸۶/۳/۱ تاریخ پذیرش مقاله : ۸۶/۳/۲۲

چکیده:

زمینه و اهداف: برخی اسانس‌های گیاهی و اجزای شیمیائی فعال آنها، دارای اثرات ضد باکتریائی بوده و به عنوان عوامل ضدمیکروبی استفاده می گردند. داروی رسپیتول *B*، (شرکت داروسازی باریج اسانس) یک ترکیب مشابه‌سازی‌شده با نمونه خارجی با عنوان منتوفین می‌باشد. این فرآورده از منتول و اسانس اکالیپتوس *(E. globulus)* تشکیل شده است.در این مطالعه، اثر ضد میکروبی این دو فرآورده با میزان اثر بخشی اجزای آن بر باکتری‌ها، قارچ‌ها و مخمرها، بررسی گردید.

روش بررسی: جهت مقایسه اثر ضد میکروبی دو فرآورده از روش ماکروبراث و دیسک دیفیوژن استفاده گردید.

یافته ها: باکتری‌های گرم مثبت ، مخمرها و قارچ‌ها در مقایسه با باکتری‌های گرم منفی حساسیت بیشتری نسبت به رسپیتول *B* نشان دادند. بررسی اجزای این فرآورده‌ها نشان می‌دهد که خاصیت ضد میکروبی منتول از اسانس اکالیپتوس بیشتر می باشد. اسانس اکالیپتوس دارای خاصیت ضد میکروبی خوبی مقابل*Vibrio cholera, Aspegilus flavus, Staphylococcus aureus* می‌باشد اما بر سایر میکروب‌ها اثر چندانی ندارد. منتول دارای اثر ضد میکروبی قابل توجهی بوده و حضور آن در رسپیتول *B* اثر ضد میکروبی رسپیتول *B* را تقویت می کند. باکتری های *Salmonella typhi, Escherichia coli, Pseudomonas aeruginosa* مقاومت بیشتری نسبت به رسپیتول *B* از خود نشان دادند.

نتیجه گیری: اثر ضد میکروبی رسپیتول *B* مشابه منتوفین بوده ومی توان از این فرآورده به جای نمونه خارجی استفاده نمود.

کلید واژه ها: رسپیتول B، اسانس اکالیپتوس، منتول، منتوفین، اثر ضدمیکروبی

مقدمه:

داروی رسپیتول ـ B دارویی مشابه با منتوفین است. منتوفین یک ترکیب گیاهی است که از منتول و اسانس اکالیپتوس تهیه شده است. رسپیتول B به دو فرم آشامیدنی و استنشاقی (اسپری در سالن) در کنترل و درمان بیماری‌های تنفسی مانند برونشیت و آنفلونزا ی طیور مصرف می‌شود. این ترکیب در مواردی که مصرف آنتی‌بیوتیک‌ها، مقدور نبوده و مقاومت آنتی‌بیوتیکی ایجاد گردیده است و یا در گرمای خشک و شدید بویژه هنگامی که غشای موکوسی مجاری تنفسی خشک شده و جوجه‌ها با مشکل تنفس مواجه می‌شوند استعمال می‌گردد (۱). طیور پس از واکسیناسیون معمولا واکنش‌هایی را نشان می دهد که این امر، نه تنها باعث افت پاسخ سیستم ایمنی بدن به واکسن می‌گردد بلکه به عنوان یک عامل استرس‌زا، بازده گله را تحت

تأثیر قرار داده و باعث افزایش تلفات می‌گردد. منتوفین باعث پاسخ بهتر سیستم ایمنی بدن طیور گردیده و با ممانعت از واکنش‌های حاد ناشی از واکسن، موجب کاهش تلفات و افزایش بازده گله می گردد(۲). تحقیقات بیشتر در کشور آفریقای جنوبی نشان می‌دهد که مصرف منتوفین در آب آشامیدنی، علائم بیماری کریزای عفونی ناشی از هموفیلوس پاراگالیناروم*Haemophilus (paragalinarum)* را به شدت کاهش می‌دهد (۲). اثر منتوفین بر گله‌های مرغ نژاد گوشتی که بیماری نیوکاسل *VV* همراه با عفونت *Orintobacterium rhinotracheal* داشته‌اند در یک گروه شاهد همراه با آموکسی‌سیلین و بدون آن در کشور مصر مورد بررسی قرار گرفته است (۲) این نتایج نشان‌دهندهٔ وزن‌گیری بهتر گروه درمان شده با گروه منتوفین می‌باشد. رسپیتول ـ B یک ترکیب گیاهی است که مواد موثره آن دقیقاً مشابه منتوفین می‌باشد و مرکب از منتول و اسانس اکالیپتوس می‌باشد (۳) . اسانس اکالیپتوس با روش تقطیر از برگ‌ها و سرشاخه‌های جوان *Eucalyptus globulus L.B* استخراج می شود. اجزای مهم اسانس عبارتند از ۸۰٪ ۱و۸- سینئول (اکالیپتول)، پاراسمین، آلفا ـ پی‌نن می‌باشد.منتول جزء اصلی اسانس گیاه نعناء فلفلی *(Mentha piperita)* می باشد(۴). در این مطالعه اثر ضد میکروبی رسپیتول B و منتوفین و محلول اکالیپتوس و منتول بر باکتری‌ها، قارچ‌ها و مخمر بررسی گردید.

مواد وروش ها :

مواد شیمیائی: داروی رسپیتول *B* ، محلول منتول و محلول حاوی اسانس اکالیپتوس از شرکت داروسازی باریج‌اسانس تهیه شد. داروی منتوفین از شرکت *Ewabo*آلمان تهیه گردید. محلول منتول از لحاظ مواد جانبی کاملا مشابه فرمول رسپیتول *B* است اما از لحاظ مواد موثره فاقد اسانس اکالیپتوس و میزان منتول دو برابر نسبت به رسپیتول-**B** است و در محلول اکالیپتوس ،موادجانبی با رسپیتول-**B** یکسان و دارای دوبرابر اسانس اکالیپتوس و فاقد منتول می باشد.

سوش‌های میکروبی: در این مطالعه از سویه‌های *B.subtilis, S.aureusATCC25923 ATCC6051,B.cereusATCC1247 ,S.typhiATCC14028,S.marscenesATCC1187,P.aerugin .pneumoniaeATCC osaATCC9027,E.coliATCC8739 10031* وسویه‌کلینیکی *V. chlorae* استفاده گردید. همچنین از ۲ سوش قارچی *A.flavus* (جدا شده از طیور)و *A.niger ATCC 16404* و از مخمر *C. albicans ATCC 10231* استفاده گردید.

روش کار:

آزمایشات ضد میکروبی به همان روش *Griggs* و همکاران انجام شد (۵). به طور خلاصه ۲-۱ کلنی از هر میکروب به طور مجزا (باکترها و قارچ‌ها ومخمر) در سرم فیزیولوژی، سوسپانسیون تهیه شد و کدورت آن با *0.5* مک‌فارلند تنظیم گردید. سوسپانسیون باکتری آماده با سوآب استریل روی محیط مولرهینتون آگار و سوسپانسیون قارچ و مخمر روی محیط سابورودکستروز آگار،کشت گردید. دیسک‌های استریل (به قطر *6mm*) آغشته به ۲۰ میکرولیتر از ترکیبات فوق(منتول،منتوفین،اسانس اکالیپتوس،رسپیتول*B*)به طور جداگانه روی کشت میکروبی قرار گرفت. پلیت به مدت ۲۴ ساعت در دمای $35^{o}C$ انکوبه گردید و قطر هاله عدم رشد آنها بر حسب میلی‌متر تعیین گردید.

از آن جایی که فرمول های فوق دارای امولسیفایرهایی فاقد خاصیت ضدمیکروبی می باشند در محیط کشت به راحتی حل می گردند.حداقل غلظت مهار کنندهٔ رشد و حداقل غلظت کشنده رشد با استفاده از سری دو برابر رقت ماکرو براث دایلوشن (۱۵/۶۲۵-۱۰۰۰*µg/ml*) در محیط *MHB* برای سویه‌های باکتریائی و *MHB* حاوی ۲٪ دکستروز برای سویه‌های قارچی تعیین گردید (۶).

یافته ها:

قطر هاله عدم رشد منتول بر میکروارگانیسم ها از رسپیتول *B* و منتوفین بیشتر و همچنین قطر هاله عدم رشد اسانس اکالیپتوس از رسپیتول *B* ، منتوفین ومنتول کمتر است (جدول شماره ۱).براساس قطرهاله عدم رشد باکتری‌های گرم مثبت و کاندیدا آلبیکانس نسبت به ترکیبات فوق حساستر از سایر باکتری‌های گرم منفی بودند. این نتایج در استافیلوکوکوس اورئوس و کاندیدا آلبیکانس با نتایج مربوط به حداقل غلظت مهار کننده رشد*(MIC)*منطبق است. در باکتری‌های گرم منفی *Klebsiella pneumoniae* قطر هاله عدم رشد بزرگتری نسبت به سایرباکتری های گرم منفی و *P.aeruginosa* و *E.coli* و *S.typhi* قطر هاله عدم رشد کوچکتری نسبت به ترکیبات فوق نشان دادند(جدول شماره ۱).

اسانس اکالیپتوس بر سویه های بالینی *Vibrio cholera* ، *S. aureus* و قارچ *A. flavus* (نمونه کلینیکی طیور) موثر بوده ولی بر سایر میکروارگانیسم‌ها تأثیرچندانی نداشت.

اثر ضد میکروبی منتول بر مخمرها، قارچ‌ها و باکتری‌های گرم مثبت مطالعه شده در جدول شماره ۱ چشمگیربود ولی بر *E .coli* ، *S. typhi, P.aeruginosa* تأثیر قابل توجهی نداشت. در بین باکتری‌های گرم مثبت مطالعه شده *Bacillus subtilis* نسبت به

ترکیبات فوق مقاوم‌تر از *S.aureus, B. cereus* و قارچ *A.flavus* است و قارچ *A. niger* نسبت به *A. flavus* مقاومت بیشتری نشان داد.

حداقل غلظت کشندگی باکتری *(minimal bactericidal concentration: MBC)* مربوط به *Bacillus subtilis, Bacillus cereus* از همه باکتری‌های مطالعه شده بیشتر بوده و میزان آن حدود ۴ برابر بیشتر از *MIC* آن تعیین گردید (جدول شماره ۲). حداقل غلظت مهار کننده رشد *(MICs)*، مربوط به *S. aureus* ، *A. niger*، *A. flavus*،*C. albicans* کمتر از*MIC* ی مربوط به باکتری‌های گرم منفی می باشد. قطر هاله عدم رشد رسپیتول *B* ، منتوفین و منتول بر *K. pneumoniae* از همه باکتری‌ها ی گرم منفی بزرگتر می باشد (جدول شماره ۱) ولی *MBC, MIC* آن، با سایر باکتری‌های گرم منفی برابر است. *MIC*ی قارچهای *C. albicans, A.flavus A.niger* از *MIC* باکتریهای گرم منفی کمتر بود. *MBC*ی *A.flavus, A.niger* حدود ۴ برابر *MIC*ی آن بوده و لی در *MBC, S. aureus, C. abicans* برای همه ترکیبات فوق دوبرابر *MIC*ی آن تعیین گردید. اسانس اکالیپتوس نسبت به *S.aureus* کمترین *MIC* را دارا می باشد. در بین باکتری‌های گرم منفی *MBC* مربوط به *S. typhi* از همه بیشتر بوده که نشان‌می دهد برای از بین بردن این پاتوژن دوز بیشتری از فرآورده لازم است. اثر منتوفین و رسپیتول *B* بر همه میکروارگانیسم‌های مطالعه شده یکسان است که نشان‌می دهد که این ۲ فرمول (منتوفین،رسپیتول*B*)دقیقاً دارای ترکیبات مشابه با یکدیگر می باشند.

جدول شماره ۱:هاله ممانعت رشد میکروبی(میلی متر)

	S. aureus	*B. cereus*	*B. subtilis*	*E. coli*	*P. aeruginosa*	*S. marscens*	*K. pneumoniae*	*S. typhi*	*V. chloreae*	*C. albicans*	*A. niger*	*A. flavus*
Respitol B	۱۶،۴	۱۳،۴	۱۲	-	-	۹،۲	۴۳،۳	۸،۴	۱۹،۱	۲۵،۲	۱۴،۷۵	۲۳
Mentofin	۱۵،۷	۱۱،۲	۱۱،۴	-	-	۸،۸	۳۹،۳	۸،۴	۱۹،۳	۲۸،۵	۱۶،۲۵	۲۳
Menthol	۲۲،۸	۲۳،۴	۲۱،۷	۸،۸	-	۱۲،۷	>۷۰	۹،۶	۲۴،۱	۳۹،۵	۳۵	۳۰
Eucalyptus oil	۱۴،۲	-	۶،۸	-	-	۷،۵	۸	۸،۲	۱۴،۷	۶،۵	۸	۱۲،۵

جدول شماره۲: بررسی خاصیت ضد میکروبی با استفاده از روش ماکروبراث دیلوشن

		S. aureus	*B. cereus*	*B. subtilis*	*E. coli*	*P. aeruginosa*	*S. marscens*	*K. pneumoniae*	*S. typhi*	*V. chloreae*	*C. albicans*	*A. niger*	*A. flavus*
Respitol B	**a**	۱۲۵	۲۵۰	۲۵۰	۲۵۰	۲۵۰	۲۵۰	۲۵۰	۲۵۰	۲۵۰	۱۲۵	۱۲۵	۱۲۵
	b	۲۵۰	>۱۰۰۰	>۱۰۰۰	۵۰۰	۵۰۰	۵۰۰	۵۰۰	۵۰۰	۱۰۰۰	۵۰۰	۵۰۰	۲۵۰
Mentofin	**a**	۱۲۵	۲۵۰	۲۵۰	۲۵۰	۲۵۰	۲۵۰	۲۵۰	۲۵۰	۲۵۰	۱۲۵	۱۲۵	۱۲۵
	b	۲۵۰	>۱۰۰۰	>۱۰۰۰	۵۰۰	۵۰۰	۵۰۰	۵۰۰	۵۰۰	۱۰۰۰	۵۰۰	۵۰۰	۲۵۰
Menthol	**a**	۱۲۵	۲۵۰	۱۲۵	۲۵۰	۲۵۰	۲۵۰	۱۲۵	۲۵۰	۲۵۰	۱۲۵	۱۲۵	۱۲۵
	b	۲۵۰	>۱۰۰۰	>۱۰۰۰	۵۰۰	۲۵۰	۲۵۰	۱۲۵	۲۵۰	۵۰۰	۵۰۰	۵۰۰	۲۵۰
Eucalyptus oil	**a**	۶۲،۵	۲۵۰	۲۵۰	۲۵۰	۲۵۰	۲۵۰	۲۵۰	۲۵۰	۲۵۰	۱۲۵	۱۲۵	۱۲۵
	b	۲۵۰	>۱۰۰۰	>۱۰۰۰	۵۰۰	۵۰۰	۵۰۰	۵۰۰	۵۰۰	۱۰۰۰	۵۰۰	۵۰۰	۲۵۰

a =MIC (µg/ml)

b=MBC (µg/ml)

بحث :

اسانس‌های گیاهی، ترکیب پیچیده‌ای از اجزای مختلف شیمیائی با مقادیر گوناگون می باشند. بعلت تغییرات زیاد در این ترکیبات، اثرات بیولوژیکی اسانس‌ها متفاوت می باشد. خواص ضد میکروبی برخی از اسانس‌های گیاهی شناخته شده است(۷). با توجه به این خواص و سایر اثرات بیولوژیکی، اسانس ها بعنوان یک جایگزین مناسب برای آنتی‌بیوتیک ها با اهداف درمانی(۷) و یا در فرآورده‌های آرایشی ـ بهداشتی و نیز صنایع غذائی(۸) مورد توجه قرار گرفته اند.

رسپیتول *B* به عنوان یک ترکیب ۱۰۰٪ گیاهی و محلول در آب، مشابه با نمونه خارجی(منتوفین) طراحی شده است. این فرآورده، به علت وجود سینئول مانع از بسته‌شدن مجاری تنفسی و ترشح موکوس گردیده و دارای اثرات ضد التهابی و ضد درد به صورت موضعی می باشد(۱،۹). جهت پیشگیری و کنترل و درمان بیماری‌های تنفسی نظیر *CRD*، برونشیت، آنفلونزا، نیوکاسل، *ORT*و کریزای عفونی مورد استفاده قرار گرفته و عوارض بعد از واکسیناسیون را در طیور کاهش

می‌دهد (۲). همه این خواص مربوط به اجزای تشکیل‌دهنده فرمول رسپیتول *B* یعنی اسانس اکالیپتوس و منتول می‌باشد(۳-۱).

اسانس اکالیپتوس یک ترکیب ضد التهابی، ضد عفونی‌کننده و ضد باکتری ضعیف، ضد ویروس، ضد نزله و خلط‌آور می‌باشد. این اسانس از التهاب غشاهای موکوسی مخاط بینی، مخاط حلق ـ بینی، التهاب گوش وسینوس‌ها و التهاب واژن ممانعت می‌کند(۹).*Jouad et al* نشان داده اند که عصاره برگ اکالیپتوس به طور چشمگیری غلظت پایه انسولین پلاسما را کاهش می دهد و به مصرف عصاره برگ اکالیپتوس در درمان دیابت ملیتوس اعتبار می بخشد(۱۰) اسانس اکالیپتوس از سنتز پروستاگلاندین ممانعت کرده و هنگامی که به صورت موضعی مصرف گردد دارای اثرات *hyperemic* می‌باشد. همچنین دارای اثرات خلط‌آوری و ضد سرفه بوده و عملکرد ضعیف ریه‌ها را بهبود می‌بخشد (۹). فعالیت ضد باکتریایی عصاره برگ اکالیپتوس بر *S. aureus* ، *S. pyogenes* ،*S. pneumoniae* و هموفیلوس آنفلونزا که از بیماران با اختلالات تنفسی جدا شده حاکی از تاثیر آن بر باکتریها ی ذکر شده در شرایط برون تنی می باشد (۱۱). فعالیت ضد باکتریائی اسانس اکالیپتوس با استفاده از تکنیک میکرواتمسفر یک در مقابل *E.coli, E.coli clp514* مقاوم به چندین دارو که از نمونه ادرار جدا شده بودند نشان دهنده موثر بودن این اسانس در مقابل هردو باکتری خصوصاً *E. coli clp514* می باشد. میزان *MIC* برای هر دو باکتری در محدودهٔ *µl* ۷۰-۶۰ است (۱۲). در مطالعه ما که با استفاده از تکنیک ماکروبراث دیلوشن و دیسک دیفیوژن انجام شد نشان داده شد که اسانس اکالیپتوس در مقابل *E. coli 8739* فاقد اثر ضد باکتری می‌باشد. همچنین فعالیت ضد میکروبی عصارهٔ برگ ۲۶ گونه اکالیپتوس با یکدیگر مقایسه شده است. عصارهٔ برگ گونه‌های *E. globulus, E. maculata, E. viminalis* به طور مشخصی از رشد باکتری های *methicillin-resistanceS.aureus (MRSA)* ,*P.acnes,B.cereus,E.faecalis,Alicyclobacillus.acidote rrestris* و قارچ*T. mentagrophytes* ممانعت می‌کند اما فعالیت ضد باکتری قوی علیه باکتری‌های گرم منفی نشان نداده است (۱۳). در این مطالعه مشاهده شد که اسانس اکالیپتوس تهیه شده از گیاه بومی ایران نیز فاقد اثر بر روی باکتری های گرم منفی می باشد که علت احتمالی آن حضور لیپوپلی‌ساکاریدهای دیوارهٔ سلولی باکتری‌های گرم منفی می باشد. لیپوپلی ساکاریدهای دیواره سلولی، احتمالاً مانع از رسیدن ترکیبات فعال اسانس به غشای سیتوپلاسمی باکتری‌های گرم منفی می‌شود(۱۴،۱۵) همچنین اسانس اکالیپتوس نسبت به باسیلوس سوبتیلیس و سرئوس بی تاثیر بودکه این اثر شاید به خاطر اشکال مقاوم سلولی است که باکتری در شرایط نامناسب تولید می‌کند.اکالیپتومول موجود در اسانس اکالیپتوس به تنهایی هیچگونه فعالیتی، ضد کپک های آزمایش شده نشان نمی دهد (۱۶) در حالی که در مطالعه فوق اسانس اکالیپتوس دارای، اثر ضد قارچی بوده(جدول شماره ۲) نشان دهنده این واقعیت است که احتمالا در بعضی شرایط اجزای فیتوشیمیایی خاص با سایر اجزا دارای اثر سینرژیسمی می باشد.قارچ‌ها، نسبت به اسانس‌های گیاهی حساستر از باکتری‌های گرم منفی می‌باشند. اطلاعات کمی در مورد نحوهٔ عملکرد اسانس‌ها و مشتقات آنها روی سلول‌های قارچی وجود دارد. به طور کلی فرآورده‌های گیاهی منجر به گرانوله شدن سیتوپلاسم(۱۷)، گسیختگی غشاء سیتوپلاسمی(۱۵،۱۸) و غیرفعال شدن یا ممانعت از فعالیت آنزیم‌های درون سلولی و برون‌سلولی(۸)،متلاشی شدن دیواره سلولی (۹)و تخریب سیستم انتقال الکترون (۲۰)می‌باشد این رخدادهای سلولی به طور مستقل و یا به صورت همزمان، می‌تواند با ممانعت از رشد مسیلیوم به حداکثر برسد(۸،۱۸). بر روی اثر ضد میکروبی منتول کار زیادی انجام نشده است. منتول جزء اصلی اسانس نعنافلفلی است (۴).

نتیجه گیری:

منتول دارای اثر ضد خارش، ضد درد و دارای اثرات آنتی‌سپتیک بوده به طوری که از این جزء به طور وسیعی برای تسکین علائم برونشیت و گرفتگی بینی استفاده می‌شود و به صورت داخلی بعنوان ضد نفخ و مسکن معده استعمال می گردد. نتایج آزمایشات ما به خوبی نشان می‌دهد که منتول دارای اثر میکروب‌کشی خوبی علیه باکتری‌های گرم مثبت و مخمرها و قارچ‌ها می‌باشد اما اثر میکروب‌کشی آن بر *E. coli*، *P.aeruginosa* و *S. typhi* بسیار ضعیف است. در مورد اثر منتول بر برخی سویه‌های میکروبی حداقل غلظت مهارکننده رشد با حداقل غلظت کشنده رشد برابر است. در فرمول منتوفین یا رسپیتول *B* اثر بالای ضد میکروبی منتول بوسیله اسانس اکالیپتوس کاهش می‌یابد به طوری که اثر ضد میکروبی منتول از منتوفین یا رسپیتول *B* بیشتر و اثر اسانس اکالیپتوس از آن دو کمتر است.

تقدیر و تشکر

نویسندگان این مقاله از آقایان محسن بخردی،مهندس علیرضا صفایی ،مهندس محسن بذرافشان و دکتر مجید ترابی گودرزی که ما را در اجرا ی این طرح یاری نمودند ، تشکر وقدردانی مینماید همچنین از جناب آقای مهندس حجازی مدیر عامل شرکت داروسازی باریج اسانس به طور ویژه قدردانی مینماید.

فهرست مراجع:

1. Riechelmann H, Brommer C, Hinni M. Response of human ciliated respiratory cells to a mixture of *menthol*, *eucalyptus oil* and *pine needle oil*. *Arzneimittelforschung.* 1997,**47**:1035-1039.
2. Barbour EK, Dankar S. Essential oils of *Eucalyptus* and *peppermint* improve the homogeneity of immune responses and performance in MG/H9N2-infected broilers. *J Am Holistic Vet Med Assoc* 2005, **24**:23-27.
3. Barbour EK,Elhakim RG,Kaadi MS,Shaib HA,Gerges DD,Nehme PAE. Evaluation of the Histopathology of the Respiratory System in Essential Oil-Treated Broilers Following a Challenge With *Mycoplasma gallisepticum* and/or *H9N2 Influenza Virus..Intern Appl Res Vet Med* 2006, **4**(4):293-300.
4. Aghel N,Yamini Y,Hadjiakhoondi A.Comparison between the essential oil and super critical carbon dioxide extraction of Mentha piperita L.cultivated in Iran.*Daru* 2002 ,**10**(2):67-9.
5. Griggs J K, Manandhar NP, Towers GHN, andTaylor RSL. The effects of storage on the biological activity of medicinal plants from Nepal, *J. Ethnopharmacol* 2001, **77**: 247-252.
6. Pepeljnjak S, Kosalec I, Kalodera Z, Kustrak D. Natural antimycotics from Uroatin plants, in plant derived antimycotics-current trends and future prospects(*eds,M.Rai,D.Mares*),*Haworth press, New York* 2003,pp:41-84
7. Cowan MM**.** Plant products as antimicrobial agent .*Clinical microbiology review*1999, **12**:564-582.
8. Brull S, Coote P. Preservative agents in foods, Mode of action and microbial resistance mechanisms. *International Journal of food microbiology*1999, **50**: 1-17.
9. Kraft K, Hobbs **C**, *Pocket guide to herbal medicine*, 1th ed, ,New york, Thieme Stuttgart, 2004, pp: 61-62.
10. Jouad H, Maghrani M, El Hassani RA, Eddouks M. Hypoglycemic Activity of Aqueous Extract of *Eucalyptus globulus* in normal and streptozotocin induced Diabeic Rats., *Journal of Herbs. Spices & Medicinal plants*2004, **10**(4):19-28.
11. Salari MH, Amin G, Shirazi MH, Hafezi ., Mohammadypour M. Antibacterial effects of *Eucalyptus globulus* leaf extract on pathogenic bacteria isolated from specimens of patients with respiratory tract disorders, *Clin. Microbiol infect* 2006, **12**(2): 194-196.
12. Mounchid K, Bourjilat F, Dersi N, Aboussavira T, Rachidai A, Tantaoui – Elaraki. A, Alaoui – Ismaili.. The susceptibility of Escherichia coli strains to essential oils of *R. officinalis* and *E.globulus*. *African Biotechnology*2005, **4** (10): 1175-76.
13. Takahashi T, Kokubo R, Sakaino M. Antimicrobial activities of *Eucalyptus* leaf extract and flavonoids from *Eucalyptus maculate*. *Letters in Applied microbiology* 2004, **39**(1):60-64.
14. Mckeegan KS,Borges – walmsley MI, walmsley AR . Microbial and viral drug resistance mechanisms, *Tends in microbiolog y*2002, **10**:85-145.
15. Jurven BJ, Kanner J, Sched F, and weisslowicz H. Factors that interact with the antibacterial of thyme and essential oil and its active constituents. *Journal of Applied microbiology*1994, **76**: 626-31.

16. Souza ALD, Lima LDO, Freire KDL,Sousa KPD. Inhibitory action of some *Essential oils* and *phytomedicals* on the growth of various molds isolated from foods. *Brazilian archives of Biology and technology*2004, **48**(2): 245-50.
17. Cox SD, Mann CM, and markham JL. The mode of antimicrobial action of the essential oil of *melaleuca alternifolia* (Tea tree oil). *Journal of Applied microbiology*2002, **88**:170-75.
18. Caccioni DLR, Guizzardi, Biondi, DM, Renda A, Roberto G. Relationships between volatile components of citrus fruit essential oil and antimicrobial action on *Pencillium digitatum* and *Penicillium italicum*, *International journal of food microbiology*2000. **88**: 170-75.
19. Odhav B, Juglal S, and Govinden R. Spices oils for the control of co-occurring mycotoxins producing fungi. *European food research and technology*2002, **65**:683-7.
20. Issov CC., Koutsoumanis K., and Nychas G JE. Inhibition of *salmonella entridis* and *staphylococcus aureus* on nutrient broth by *mint* essential oil food *research international* 2000,**48**:273-80.

مجله میکروب شناسی پزشکی ایران

سال ۱ شماره ۱ بهار ۱۳۸۶، صفحات ۴۷ – ۵۳

شناسایی ژنوم مایکوپلاسما در اسپرم مردان نابارور به روش PCR

دکترعلی اکبرسلیمانی رهبر*[۱]، مریم گلشنی[۱]، دکترفریبا فیاض[۱]، دکتر صدیقه رفیعی طبا طبایی[۲]، دکتر آرزو مرادی[۲]

۱) گروه میکروبیولوژی دانشکده پزشکی،دانشگاه علوم پزشکی شهیدبهشتی،تهران

۲) مرکز تحقیقات عفونی اطفال، دانشگاه علوم پزشکی شهیدبهشتی،تهران

نویسنده رابط : دکترعلی اکبرسلیمانی رهبر،دانشیار گروه میکروبیولوژی دانشکده پزشکی،دانشگاه علوم پزشکی شهیدبهشتی ، مرکز تحقیقات عفونی اطفال , تهران

تلفن : ۰۲۱۲۲۲۲۶۹۴۱ pedircorg@yahoo.com

تاریخ دریافت مقاله : ۸۶/۳/۲۰ تاریخ پذیرش مقاله : ۸۶/۴/۳

چکیده :

زمینه و اهداف: عفونت ژنیتال یکی از علل مهم ناباروری در مردان است. یک گروه از باکتری های مهم عامل ناباروری مایکوپلاسماها می باشند. این عفونت ها خصوصا انواع مزمن آنها با اثرات مخرب بر پارامترهای کیفی اسپرم و یا تنگی و انسداد مجاری ژنیتال باعث عقیمی مرد می شوند . از طرف دیگر با انتقال به همسر وی باعث عفونت ژنیتال ، ناباروری وسقط می گردند.هدف ازاین تحقیق جداسازی مایکوپلاسماها از اسپرم مردان نابارور به روش PCR است.در این صورت تشخیص بموقع و درمان مناسب آن باعث باز گشت قدرت باروری به بیمار می شود.

روش بررسی: در این پروژه تعداد ۱۰۰ مرد مبتلا به نا باروری مراجعه کننده بمراکز درمانی پس از معاینه و تایید بیماری توسط پزشک متخصص ، و در صورت عدم مصرف آنتی بیوتیک از یک هفته قبل انتخاب شدند. نمونه اسپرم آنها بطور استریل گرفته شده و سپس سریعا به آزمایشگاه ارسال شد. نمونه ها برای بررسی وجود اوره آپلاسما اوره آلیتیکوم و مایکوپلاسما هومینیس به روش PCR آزمایش شدند.

یافته ها: از ۱۰۰ مرد مبتلا به ناباروری ۳۳ نفر (۳۳درصد) PCRمثبت و آلوده به ارگانیسم های کلامیدیاها ، مایکوپلاسما و اوره آپلاسما بودند. ازاین تعداد، ۱۷ مورد اورآپلاسما اوره آلیتیکوم و۳ مورد مایکوپلاسماهومینیس جداشد که در مجموع۲۰ مورد (۲۰درصد) نمونه ها راشامل شدند. سابقه عفونت واژینال وسقط در همسران این بیماران بررسی ومورد مقایسه قرار گرفت. ازنمونه اسپرم بیماران اسپرموگرام نیزانجام گرفته ونتایج آن با جواب PCR مقایسه شد.

نتیجه گیری : آلودگی به مایکوپلاسماها در مردان نابارور باعث اتصال این ارگانیسم هابه اسپرماتوزوئیدها وبروز تغییرات اسپرموگرام شده و از طرفی با انتقال عفونت به همسران آنها ممکن است سقط جنین وناباوری ایجاد کند. با توجه به مشکلات موجود بر سر راه کشت این میکروارگانیسم ها ، بنظر می رسد استفاده ازروش سریع و حساس PCR جهت تشخیص این باکتری ها در بیماران با ارزش باشد.

کلید واژه ها : ناباروری،مایکوپلاسما، PCR.

مقدمه:

جهان امروز با معضل ناباروری دست به گریبان است. ناباروری در مردان بعلت تغییر در پارامترهای استاندارد کیفی اسپرم (تعداد، مورفولوژی، حرکت پیشرونده و قابلیت حیات) و ایجاد آنتی بادیهای ضد اسپرم، منجر به تنگی وانسداد مجاری سمینال و غیره شده ، در نتیجه توانایی مرد برای باروری بطور موقت یا دایم از بین می رود(۱).

عفونت های باکتریال از مهمترین علل ناباروری در مردان است. از باکتریهای عامل عفونت ژنیتال و ناباروری در درجه اول می توان به کلامیدیاها ، مایکوپلاسماها و اوره آپلاسماها (CMU) اشاره کرد. بعد از این گروه ،گنوکوک ، انتروباکتریها ، استرپتوکوکها، انتروکوکها ، گاردنرلا واژینالیس و غیره هستند که چهار مورد آخر شیوع کمتری دارند (۶- ۱).

عفونت ژنیتال فاکتور اتیولوژیکی مهمی در ناباروری مردان بشمار می رود. در نتیجه اتصال باکتری به اسپرم و یا ترشح سموم و آنزیم ها و یا از طریق تحریک سیستم ایمنی علیه اسپرم، آسیب به تمام نواحی آناتومیک اوروژنیتال ایجاد شده و در نتیجه منجر به آسیب عملکرد اسپرم و تخریب آن و سپس تنگی مجاری سمینال می گردد. مردانیکه سابقه ابتلا به STD* (بیماریهای انتقالی ازراه های جنسی) دارند و یا مبتلا به اورتریت غیر گنوکوکی مزمن یا تحت حاد هستند ویا عفونت بدون علامت گروه CMU را دارند ، ممکن است دچار نا باروری شوند(۱۵-۷).

نکته قابل توجه در این مردان آن است که عوامل عفونی در غدد جنسی آنان تجمع کرده و با اتصال به سر و بخش میانی اسپرماتوزوییدها قادرند به همسران این افراد منتقل شده و سپس ایجاد عفونت نمایند و نهایتا باعث سقط تکراری و تولد نوزاد نارس شوند.بعلاوه باید امکان انتقال عفونت از این مادران به نوزادان و ایجاد عفونت های مغزی ، تنفسی ، کنژنکتیویت و غیره را در نظر گرفت (۲۱-۱۶). اهمیت عفونتهای بدون علامت ژنیتال تا اندازه ایست که حتی در شرایط آزمایشگاهی بر قدرت باروری مرد و گاه همسرش اثر می گذارد. بطوریکه در استفاده از روشهای نوین لقاح خارج رحمی مثل Zona Pellucida و غیره در صورت آلوده بودن اسپرم به باکتریهای نامبرده ، میزان موفقیت لقاح بسیار کاهش یافته ، امکان آلودگی جنین و یا ناتوانی اسپرماتوزویید برای لقاح با تخمک بوجود می آید (۲۲).

مواد و روش ها:

از تعداد ۱۰۰ مرد نابارور مراجعه کننده به مرکز ناباروری مهدیه که تحت پوشش دانشگاه شهید بهشتی می باشد و ناباروری زوج از طریق پزشک متخصص تأیید شده بود نمونه مایع Semen گرفته شد . این افراد با توجه به عدم مصرف آنتی بیوتیک پس از تکمیل فرم اطلاعاتی و بررسی سوابق پرونده پزشکی وارد مطالعه شدند. بر اساس استانداردهای موجود بیماران از ۷۲- ۴۸ ساعت قبل می بایست پرهیز جنسی داشته و از یک هفته قبل مصرف هر گونه آنتی بیوتیک را قطع نموده باشند. نمونه ها در ظروف استریل مخصوص ادرار جمع آوری و نهایتاً تا زمان انجام آزمایش در دمای ۷۰ ° C – نگهداری می شد.

استخراج DNA :

مرحله لیز : نمونه های سیمن را به میکروتیوب ۱/ ۵ منتقل نموده و هم حجم آن lysis buffer اضافه کرده و به مدت ۴ ساعت در انکوباتور ۵۵ قرار دادیم. سپس نمونه ها را به مدت ۲۰ دقیقه در آب جوش جوشاندیم .

مرحله حذف مواد آلی : هم حجم نمونه ، فنل متعادل شده اضافه نموده و بعد از ورنکس و سانتریفوژ g / ۸۰۰۰ به مدت ۵ دقیقه مایع رویی را بدون تماس بافنل جدا کرده و در تیوپ جدید ریختیم . در این مرحله ، به محصول هم حجم آن کلروفرم اضافه نموده و دوباره این پروسه را تکرار کردیم.

مرحله تغلیظ: دو برابر حجم نمونه الکل مطلق اضافه کرده و محصول را g / ۸۰۰۰ به مدت ۵ دقیقه سانتریفوژ کردیم تا DNA رسوب نماید. پس از خارج کردن مایع رویی و خشک شدن لوله ها ، µ L ۱۰۰ اتانل ۷۰ درجه به تیوپ ها اضافه شده و دوباره همان کارها را تکرار کردیم. پس از خشک شدن لوله ها ، تعداد µ L ۵۰ آب مقطر استریل به DNA اضافه کرده و به مدت ۵ دقیقه آن را در انکوباتور یا بن ماری ۳۷ ° C قرار دادیم تا DNA حل شود. این محصول تا زمان انجام آزمایش در فریزر ۲۰ ° C – ذخیره شدند.

واکنش PCR : واکنش زنجیره ای پلیمراز یک تکنیک آزمایشگاهی است که امکان تکثیر توالی ویژه از DNA به طور انتخابی به میزان چندین میلیون نسخه امکان پذیر می گردد . مواد مورد استفاده در PCR عبارتند از ، آنزیم Taq پلیمراز ، داکسی نوکلئوتید تری فسفات (dNTP) ، بافر PCR، $MgCL_2$ ، پرایمر های زیر:

* STD: Sexually Transmitted Disease

1. CT: KL_1
TCCGGTGCGACTTACGAAGA
KL_2
AATCATTCGCGGGGATTGGT
2. UU: U_9
GAGATCAGCATTAAGCGTGACGATCT
U_9
TAGCCATCGGTCGTAGGACGC
3. MH: RNA H_1
GAATCCCTAATGCCGTGAACGGC
RNA H_2 TTCACCGTCACGCTGCATA

بهترین نتایج ، در دمای C ° ۹۵ به مدت ۳۰ ثانیه ، ۵۲ درجه به مدت ۳۰ ثانیه , دمای C ° ۷۲ به مدت ۴۵ ثانیه به دست آمد که این برنامه دمایی برای انجام ۳۵ سیکل تنظیم شد . در ضمن بطور همزمان از ژن بتا گلوبین برای کنترل واکنش PCR استفاده شد.

محصول PCR در واقع قطعه ای از DNA با طول مشخص است که تکثیر یافته و برای تأیید این تکثیر محصول PCR روی ژل آگارز الکتروفوز می شود . آگارز پلی ساکاریدی است که از واحد های تکرار شونده آرابینوز دی ساکارید مشخص شده است. پس از اینکه محصول PCR و Loading buffer حدود ۲ سانتی متر بر روی ژن حرکت کرد ، ژل داخل دستگاه قرار داده شد . اتیدیوم بروماید به داخل رشته های DNA وارد شده و با تابش نور ، UV تولید رنگ فلورسنت نمود. و محلی که باند های DNA قرار دارند مشخص گردید (۲۳).

کلامیدیا تراکوماتیس: CT

اوره آ پلاسما اوره آلیتیکوم: UU

مایکوپلاسما هومینیس: MH

یافته ها:

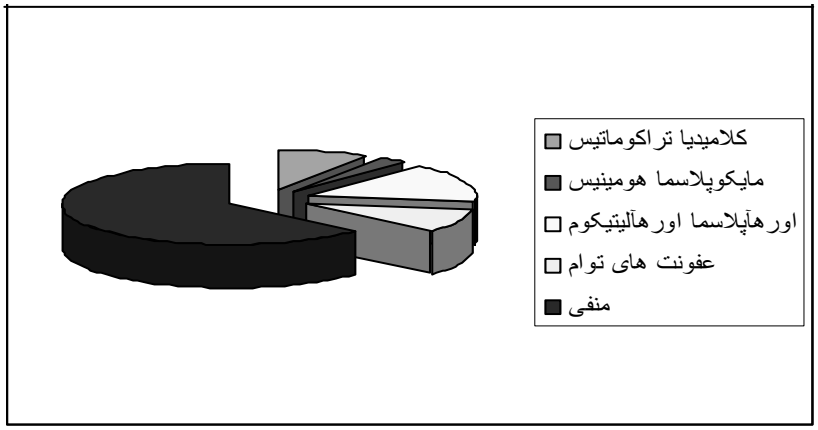
دراین تحقیق ۱۰۰نفرازمردان نابارورمراجعه کننده به مراکزدرمانی دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی تحت آزمایش قرارگرفتند. ازاین تعداد ۳۳ نفر(۳۳ درصد) آلوده به ارگانیسم های CMU بودند. که ازاین میان ۹ مورد کلامیدیا، ۱۷ مورد اوره آپلاسما اوره آلیتیکم و۳ مورد مایکوپلاسماهومینیس مثبت بودند. بنابراین ارگانیسم های مورد نظرما دراین تحقیق ۱۷ مورداوره آپلاسما و ۳ مورد مایکوپلاسما بودند که درمجموع ۲۰ مورد یا ۲۰درصد کل نمونه ها را شامل می شدند .دربین این افراد ۱۰ نفرآلودگی توام داشته و آلوده به دو یاسه ارگانیسم فوق بودند. از نظر سنی همه این بیماران در فاصله سنی۲۰تا۵۰ سال قرار داشتند.

۴۵ نفراز بیماران درگروه سنی ۲۰ الی ۳۰ سال بودند که۱۶ نفر (۳۵،۶ درصد) آنها جواب مثبت داشتند. ۴۳ نفردرگروه سنی ۳۱ الی ۴۰ سال بودند که ۱۳ نفر(۳۰،۲ درصد) جواب مثبت داشتند.۱۲ نفرباقیمانده درگروه سنی۴۱ تا۵۰ سال بودند که۴ نفراز آنها دارای جواب مثبت بودند (۳۳،۳ درصد).(جدول ۱).هم چنین میزان سن و تحصیلات بیماران مورد توجه قرار گرفت و مشخص شد با افزایش سن وتحصیلات، میزان عفونت کاهش می یابد.(جدول ۲)

از گروه ۱۰۰نفره فوق ۷ مورد(۷درصد) بنابر تشخیص پزشک متخصص مبتلا به ناباروری ثانویه بودند که هیچکدام ازآنها جواب مثبت نداشتند. نکته جالب آن است که این ۱۰۰نفر به جز مشکل ناباروری علائم بالینی دیگری نداشتند و بدون سابقه عفونت ژنیتال بودند.

دراین مطالعه سابقه عفونت واژینال در همسران این افراد تحت بررسی قرارگرفت. درنتیجه ۱۶ نفر سابقه عفونت واژینال داشتند که در ۵ مورد ازآنها نتیجه PCR مردان هم مثبت شد (۳۱،۵ در صد).همچنین بررسی سابقه سقط در میان این زوج ها نشان دادکه ۱۶ نفر سابقه سقط داشتند و از این تعداد نتیجه PCR مردان در ۸ مورد (۵۰ درصد) مثبت بود.

دربررسی اسپرموگرام۱۰۰ بیمارفوق ، ۲۵ نفر(۲۵درصد) آزوسپرمی کامل داشتند که ازاین گروه ۷ نفر(۲۸درصد)PCR مثبت بودند. ۱۱ نفر(۱۱درصد) از مردان نابارور مبتلا به الیگوسپرمی بودند که شمارش اسپرماتوزوئید بین ۱۰- ۸/ ۰ میلیون درسانتیمتر مکعب، میزان تحرک پیشرونده اسپرماتوزوئید ۲۰ - ۱درصد و اشکال طبیعی اسپرماتوزویید ۸۰-۳۰درصد داشتند. تعداد افراد PCRمثبت دراین گروه ۵ مورد (۴۵،۵درصد) بود. ۱۵ نفراز بیماران (۱۵درصد) الیگوسپرمی باشمارش اسپرماتوزویید ۲۰- ۱۰ میلیون ومیزان تحرک پیشرونده ۴۰-۵ درصد با اشکال طبیعی ۹۰-۳۵ درصد داشتند. ۸ نفر از گروه مذکور PCR مثبت (۳۳،۵۳ درصد) داشتند.۱۲ نفر(۱۲درصد) شمارش اسپرماتوزویید طبیعی بیش از ۲۰میلیون درسانتیمترمکعب با تحرک پیشرونده ۴۰-۱۰درصدونیز اشکال طبیعی۹۰-۴۰درصد داشتند.موارد مثبت PCR دراین گروه ۳ مورد (۲۵درصد) بود. ۳۷ نفر باقیمانده (۳۷درصد) از افراد نابارواراسپرموگرام کاملا طبیعی داشتند اما در این گروه نیز ۱۰ مورد (۲۷درصد) PCR مثبت بود.



نمودار شماره ۱ : توزیع فراواني باكتري هاي جدا شده از نمونه اسپرم مردان مبتلا به ناباروري مراجعه كننده به مراكز درمانی دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی به روش Multiplex PCR

جدول شماره ۱: توزیع فراوانی عفونت در مردان مبتلا به ناباروری مراجعه کننده به مراکز درمانی دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی بر حسب سن.

سن	موارد مثبت (٪)	موارد منفی (٪)	کل
۳۰-۲۰ سال	٪۳۵،۵۵	٪ ۶۴،۴۵	٪۴۵
۴۰-۳۱سال	٪۳۰،۲۳	٪۶۹،۷۷	٪۴۳
۵۰-۴۱ سال	٪۳۳،۳۳	٪۶۶،۶۶	٪۱۲
جمع	٪۱۰۰	٪۱۰۰	٪۱۰۰

جدول شماره ۲: توزیع فراوانی مردان مبتلا به ناباروری مراجعه کننده به مراکز درمانی دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی بر حسب میزان تحصیلات.

میزان تحصیلات	موارد مثبت (٪)	موارد منفی (٪)	کل
زیر دیپلم	٪۳۸،۱۸	٪۶۱،۸۲	٪۵۵
دیپلم	٪۲۹،۶۲	٪۷۰،۳۸	٪۲۷
دانشگاهی	٪۲۲،۲۲	٪۷۷،۷۸	٪۱۸
جمع	٪۱۰۰	٪۱۰۰	٪۱۰۰

بحث:

ناباروری مردان معضلی است که ٤٠ درصد از کل ناباروریها را به خود اختصاص می دهد. عوامل متعددی ممکن است در ناباروری مردان دخالت داشته باشند که عفونت باکتریایی مجاری اوروژنیتال یکی از علل عمده این بیماری است. مطابق آمارهای موجود ۳۵- ۸ درصد ناباروری مردان با عفونتهای اوروژنیتال مرتبط هستند.عفونت غدد جنسی مردان یک ریسک فاکتور مهم درایجاد ناباروری بشمار می آید. دراین میان عفونتهای بدون علامت بعلت عدم مراجعه بیماران به پزشک وپیشرفت بیماری نقش مهمتری را در ایجاد ناباروری ایفا می کنند (۲۷-۲۴). دراین مورد باید متذکرشد که درکشورما به علل باکتریال ناباروری مردان کمتر توجه شده واین گروه ازبیماران دراکثر موارد تحت آزمایش میکروبیولوژیکی قرار نمی گیرند.

عوامل باکتریایی متعددی درناباروری مردان دخالت دارند، ولی شایعترین و مهمترین آنها اورآپلاسما اورآلیتیکوم، کلامیدیاتراکوماتیس ومایکوپلاسماهومینیس هستند .این گروه باایجاد عفونت درمجاری اوروژنیتال نقش اتیولوژیکی مهمی درناباروری مردان بعهده دارند (۲۸،۲۳).

دراین تحقیق نمونه اسپرم ۱۰۰ مرد نابارور به روش ملکولی تحت بررسی قرارگرفت. تمام افراد مذکور بجز ناباروری فاقدعلائم بالینی دیگری بودند. این امر اهمیت عفونتهای مخفی رادر ایجاد ناباروری نشان می دهد.دراین تحقیق ۳۳ مورد پاسخ مثبت ازنظرارگانیسم های CMU داشتیم (۳۳درصد) که اوره آپلاسما اوره آلیتیکوم ۱۷مورد (۱۷درصد) و مایکوپلاسماهومینیس ۳ مورد (۳درصد) - درمجموع۲۰ مورد (۲۰درصد) - راشامل می شدند.

هم چنین میزان سن و تحصیلات بیماران مورد توجه قرار گرفت و مشخص شد با افزایش سن و تحصیلات، میزان عفونت کاهش می یابد . بدین ترتیب بیشترین موارد عفونت در رده سنی ۲۰-۳۰ سالگی و درافراد با تحصیلات زیر دیپلم مشاهده گردید.دراین مطالعه تغییرات اسپرموگرام بیماران نیزموردبررسی قرارگرفت.در مقایسه بااین بررسی تحقیقات زیر قابل توجه می باشند:

درتحقیقی که توسط Stellrech KA وهمکارانش در سال ۲۰۰۴در افراد ناباروردرآمریکا انجام شد، دو روشPCRوکشت برای تشخیص مایکوپلاسماهای ژنیتال از۲۶ نمونه سواب سرویکال،۲ سواب واژینال،۴ نمونه ادرارزن،۷ مورد ادرار مرد و۴۹ نمونه اسپرم مورد بررسی قرارگرفت.درنتیجه ۲۱ نمونه کشت مثبت داشتند(۲۵درصد) که در۱۷ مورد از آنها نیز PCR مثبت بود.

البته ۱۱مورد PCR مثبت باکشت منفی داشتند،بنابراین درمجموع ۲۸ مورد PCR مثبت داشتند . از این ۲۸ مورد۲۳ مورد(۸۲درصد) گونه اوره آپلاسما، ۳ مورد مایکوپلاسما (۱۱درصد) و۲ مورد (۷درصد) هردوگونه را داشتند. صرف نظر از انجام کشت ونتایج مربوط به آن نتایج این گروه بامطالعه ما قابل مقایسه است (۲۹).

در تحقیق دیگری که درسال۲۰۰۵ توسطLu MG وهمکاران درچین انجام گرفت، وجود دو بیوو اراوره آپلاسما درنمونه اسپرم۹۴۹ بیمار بررسی شد . ازاین تعداد ۱۹۹ مورد (۲۱ درصد) مثبت بودند که درمقایسه باتحقیق ما رقم بالاتری بود.درضمن کاهش قابل توجه در پارامترهای اسپرم درافرادمثبت مشاهده شد (۳۰).

دریک مطالعه که توسط Sanocka-Macie D وهمکاران درسال ۲۰۰۵ درلهستان انجام گرفت، ۲۹مرد مبتلا به عفونتهای ژنیتال و۱۴ مرد سالم از نظراثر عفونت ژنیتال برپارامترهای کیفی اسپرم بررسی شدند، نتیجه آنکه اختلال وکاهش قابل ملاحظه درحجم وسایرپارامترها درافراد مثبت در مقایسه با افراد سالم مشاهده شد. درضمن بیشترین اثرات منفی برروی پتانسیل باروری مرد، به اوره آپلاسما اوره آلیتیکوم مربوط می شد. در تحقیق ما هم اثر عفونت های مورد نظربر اسپرموگرام مشهود بود (۲۰).

درپژوهشی دیگرکه در سال ۲۰۰۳ توسط Svenstrup HF وهمکاران انجام گرفت، در شرایط *In vitro* چگونگی انتقال مایکوپلاسماژنیتالیوم به زنان از طریق مردان آلوده بررسی شد. بدین شکل که نمونه اسپرم استریل همراه مایکوپلاسماژنیتالیوم انکوبه شد. پس از گذشت زمان لازم ، تحرک اسپرماتوزوئیدها به روش ایمونوفلورسانس آزمایش شد. در نتیجه معلوم شد که مایکوپلاسماها قادرند به سر، دم وبخش میانی اسپرماتوزوئیدها متصل و باعث بی حرکت شدن آنها شوند ولی تعداد کمی از آنها بدون آنکه باعث بی حرکت شدن اسپرماتوزوئیدها شوند، به آنها متصل شده واز آنها بعنوان ناقل استفاده می کنند.درتحقیق مانیز اثرات مخرب مایکوپلاسماها بر پارامترهای اسپرموگرام از جمله حرکت اسپرماتوزوئیدها مشخص می باشد (۷).

درتحقیق دیگری که درسال ۲۰۰۱ توسطRodringuer R و همکاران دراسپانیا انجام شد با بررسی۳۷۶ زوج نابارور ۴۷،۴درصد ازاین افراداپاتوژنهای مختلف داشتند که ازان میان ۲۳،۵درصد اوره آپلاسما اوره آلیتیکوم و۴،۸درصد مایکوپلاسما هومینیس تشخیص داده شد (۳۱). گرچه آمار این تحقیق بانتایج مطالعه مامتفاوت است ولی نسبت کاهش موارد مایکوپلاسماهومینیس دربرابر اوره آپلاسما اوره آلیتیکوم درهردوتحقیق مشابه است.

نتیجه گیری :

باتوجه به آمارهای موجود و درصد قابل توجه افراد آلوده به این میکروارگانیسمها ، بررسی باکتریولوژیک مردان نابارورمراجعه کننده به کلینیکهای ناباروری امری ضروری بوده و استفاده ازیک آزمایش مناسب که درزمان کوتاه وبادقت بالاوجود این پاتوژنها را درمجاری اوروژنیتال مردان آشکارسازد مفید بنظرمی رسد. باوجودیکه روش کشت در اکثر مواردبرای تشخیص باکتری ها توصیه می شود، اما با توجه به مشکلات موجود جهت کشت این باکتری ها این روش کمترمورد استفاده قرارمی گیرد. روش های ایمونولوژیک نیز محدودیتهای خاص خود رادارند. بنابراین باتوجه به دقت و حساسیت روشهای ملکولی ازجمله PCR، استفاده از این روش جهت تشخیص میکروارگانیسم های مذکور توصیه می گردد.

پیشنهادات:

باتوجه به لزوم تشخیص بموقع عفونتهای مایکوپلاسمایی جهت درمان آنها درمردان نابارور ، موارد زیرتوصیه می گردد:

۱- بررسی باکتریولوژیک مردان نابارور امری ضروری است.

۲- درصورت ابتلای مردبه عفونت اوروژنیتال، درمان همزمان وکامل زوجین بااستفاده ازآنتی بیوتیک های مناسب انجام شود.

۳-نمونه مناسب جهت بررسی این عفونتها درمردان نابارور بدون علامت، نمونه اسپرم می باشد.

۴-باتوجه به مشکلاتی چون زمان طولانی ومشکلات دیگر در روش کشت ونیز محدودیت روشهای ایمونولوژیک ، لزوم تشخیص سریع ودقیق آلودگی اسپرم بااستفاده ازروشهای نوین ملکولی مانندPCRمحرزمی گردد.

۵- آموزش همگانی درزمینه توجه بیشتربه بهداشت جنسی و پیشگیریهای لازم امری ضروری است .

تشکر و قدردانی:

بدینوسیله مراتب تشکروقدردانی خود را ازجناب آقای دکترعبدا...کریمی ریاست محترم مرکزتحقیقات عفونی اطفال وکلیه همکاران این مرکزکه ما را در انجام این تحقیق یاری نموده اند اعلام می نمایم.

فهرست مراجع:

۱- خلیلی م ، بررسی عفونت باکتریایی برروی کیفیت اسپرماتوزویید در مردان نابارور ، خلاصه مقالات چهارمین کنگره میکروبشناسی دانشگاه شاهد ، دانشکده پزشکی، آبان ۱۳۸۰ ، ص۴۹

۲- مظفری نور الف ، حریری ع ،سیفی م ، بررسی آلودگی مایکوپلاسمایی دستگاه ادراری- تناسلی آقایان ، خلاصه مقالات چهارمین کنگره میکروبشناسی دانشگاه شاهد، دانشکده پزشکی ، آبان ۱۳۸۰ ، ص۵۷.

3-Qin KG, Hou YX, Zhang LY, Li MH, Yang SX, Ma Y. A case control study on the risk factor of male's infertility. *Zhonghua Liu Xing Bing Xue Za Zhi*,2003; 24(1):30-32 .

4-Kjaergaard N, Kristensen B, Hansen ES, Farholt S, Schonheyder HC, Uldbjerg N Madsen H. microbiology of semen specimens from males Attending a fertility clinic. *APMIS*. 1997 ;**105(7):**566-570.

spermatozoa. *Human Reproduction*, 1998; 13(10)2756-2761

10-Rose BI , Scott B. Sperm motility , morphology , hyperactivation , and ionophore-induced acrosome reactions after overnight incubation with mycoplasma. *Fertil. Steril*, 1994; **61(2)**: 341- 348.

5-Corradi G, Molnar G, Panovics J, Lindeis ZF. Significant bacteriospermia value and limits of sperm count in andrology . *Orv Hetil.* 1992**; 25:** 133(43): 2759-2762, 2765-2766.

6-Purvis K, Christiansen E . Infection in the male reproductive tract , Impact diagnosis and treatment in relation to male infertility . *Int J Androl* . 1993; **16(1)**: 1- 13.

7-Svenstrup HF, Fedder J, Abraham-Peskir J, Birkelund S, Christiansen G.

Mycoplasma genitalium attaches to human spermatozoa. *Human Reproduction*, 2003; **18(10)**: 2103 -2109.

8-Xu C, Sun GF, Zhu YF, Wang YF. The correlation of Ureaplasma urealyticum infection with infertility. *Andrologia*, 1997 ; **29(4):** 219-226.

9- Nunez-Calonge R, Caballero P, Redondo C, Baquero F, Martinez - Ferrer M, Meseguer MA. Ureaplasma Urealyticum reduces motility and induces membrane alteration in human

11- Gdoura R , Keskes- Ammar L , Bouzid F , Eb F , Hammami A , Orfila J . Chlamydia trachomatis and male infertility in Tunisia . *Eur J Contracept Reprod Health Care* , 2001 ;**6(2)** : 102-107.

12-Alexandre C , Siboulet A , Catalan F , Deubel V . Male infertility and mycoplasma infections . *Rev Fr Gynecol Obstet* , 1976; **71(10)** : 539 -541.
13-Cimino C , Borruso AR , Napoli P , Cittadini E . Evaluation of the importance of Chlamidia T . and / or Mycoplasma H . And/ or Ureaplasma U . genital infections and of antisperm antibodies in couples affected by muco- semen incompatibility and in couples with unexplained infertility . *Acta Eur Fertil* . 1993; **24(1)** : 13-17
14-Horner P, Thomas B, Gilroy CB, Egger M, Taylor-Robinson D. Role of Mycoplasma genitalium and Ureaplasma urealyticum in acute and chronic nongonococcal urethritis. *Clin Infec Dis*, 2001; **32(7):**995-1003.
15-Bornman MS, Mahomed MF, Boomker D, Schulenburg GW, Reif S, Crewe – Brown HH. Microbial flora in semen of infertile african men at Garankuwa hospital. *Andrologia,* 1990; **22(2):**118-121.
16-Taylor-Robinson D, Furr PM. Genital mycoplasma infections. *Wien Kiln Wochenschr*, 1997; 8;109(14-15): 578-83.
17-Samra Z Soffer Y, pansky M . Prevalence of genital Chlamydia and mycoplasma infection in couples attending a male infertility clinic. *Eur J Epidemiol*, 1994; **10(1):**69-73.
18-Taylor-Robinson D. Mycoplasma genitalium- an up - date. *International J STD & AIDS* 2002 ; **13(3):**145-151.
19-Lluki N, Lebel P, Boucher M, Doray B, Turgeon J, Brousseau R. Comparison of polymerase chain reaction assay with culture for detection of genital mycoplasma in perinatal infection. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 1998; **17**: 255-263.
20-Jalava J, Laurikainen E, Karkkainen U, Alanen A, Aaltonen R *et al.* Cervical Ureaplasma urealyticum colonization: comparison of PCR and culture for it's detection and association with preterm birth. Scand J Infect Dis, 2002;**34(1)**:35-40
21-Yoon BH, Romero R , lim JH , Shim SS , Hong JY. The clinical significance of detecting Ureaplasma urealyticum by PCR in the amniotic fluid of patients with preterm labor. *Am J Obstet Gynecol*, 2003; **189(4)**:919-924.
22-Levy R, Layani- Milon, D' Estaing G , Najioullah, Lornage, Aymard , et al. Screening for Chlamydia trachomatis and Ureaplasma urealyticum infection in semen from asymptomatic male partners of infertile couples prior in vitro fertilization. *Int J Androl*, 1999; **22(2):** 113-118.
23-Abele-Horn M wolff C ,Dressel P, Zimmermann A, vahlensieck W, Pfaff E *et al.* Polymerase Chain Reaction versus culture for detection of Ureaplasma urealyticum and Mycoplasma hominis in the urogenital tract of adults and the respiratory tract of newborns. Eur *J Clin Microbiol Infect Dis*. 1996; 15(2): 595-598.
24-Askienazy- Elbhar M . Male Genital infection: the point of view of the bacteriologist. *Gynecol Obstet Fertil.* 2005; **33(9):** 691-697.
25- Li HY and Liu JH. Influence of male genital bacterial infection on sperm function. Zhonghua Nan Ke Xue. 2002; **8(6)**: 442-444.
26-Keck C Gerber – Schafer C, Clad A, Wilhelm C . Seminal tract infections: impact on male fertility and treatment options. Hum Rep roduction Update. 1998; **4(6)**:891-903.
27-Diemer T Ludwig M, Huwe p ,Hales DB, weidner W. Influence of urogenital infection on sperm function . *Curr Opin Urol.* 2000; **10(1)**: 39-44.
28-Sanocka D, Frezek M, jdrzejczak P, Szuma – KKOLA, Kuripsz M. Male genital tract infection: an influence of leukocytes and bacteria on semen. *J Reprod. Immunology*. 2004; **62(1-2)**:111-24
29- Stellrecht KA Woron AM, Nada G, Mishrik G vanezia RA. Comparison of multiplex PCR assay with culture for detection of genital mycoplasmas. *J Clin Microbiol.* 2004; **42(4)**: 1528-1533.
30-Lu MG, shi JL and XUC. Establishment and application of the approach to detecting two biovars of Ureaplasma urealyticum in human semen. Zhonghua Nan Ke Xue. 2005; *11(3)* : 175-184.
31-Rodringuez R, Hernandez R, Fuster F, Torres A , Prieto P, Alberto j. Genital infection and infertility. Enferm Infecc Microbiol Clin . 2001; **19(6):** 261-266.

مجله میکروب شناسی پزشکی ایران

سال ۱ شماره ۱ بهار ۱۳۸۶، صفحات ۵۵ – ۶۰

تعیین عیارسرمی آنتی بادی های اختصاصی بر علیه مایکو پلاسما پنومونیه ، کلامیدیا پنومونیه و لژیو نلا پنوموفیلا در زائرین ایرانی در طی مناسک حج تمتع سال ۱۳۸۳

دکتر اکبر میرصالحیان[۱] ، دکتر سید منصور رضوی[۱] ، دکتر حسین ضیایی اردکانی[۲] ، کبری بامداد[۱] ، سید محمد میر افشار[۱] ، فرزانه باذرجانی[۱]

۱) گروه میکرب شناسی، دانشکد ه پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی تهران

۲) گروه چشم پزشکی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی شهید بهشتی

نویسنده رابط : دکتر اکبر میرصالحیان، گروه میکرب شناسی، دانشکد ه پزشکی دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی تهران

تلفن : ۸۸۹۵۵۸۱

تاریخ دریافت مقاله : ۸۶/۳/۲۰ تاریخ پذیرش مقاله : ۸۶/۴/۳

چکیده:

زمینه و اهداف: عفونت های دستگاه تنفسی یکی از معمولی ترین بیماریهای زائرین ایرانی در حین انجام اعمال حج تمتع محسوب می گردد. بهمین منظور عیار آنتی بادیهای اختصاصی مایکو پلاسما پنومونیه، کلامیدیا پنومونیه و لژیونلا پنوموفیلا در سرم زائرین مورد ارزیابی قرار گرفت .

روش بررسی: نمونه های سرمی ۱۲۸ نفر از زائرین قبل از عزیمت و یک ماه پس از بازگشت به کشور جمع آوری و به منظور تعیین عیار آنتی بادی بر علیه مایکو پلاسما پنومونیه، کلامیدیا پنومونیه و لژیونلا پنوموفیلا با استفاده از روش ایمونوفلوئورسنس و الایزا مورد سنجش قرار گرفت.

یافته ها: عیارآنتی بادی IgM بر علیه کلامیدیا پنومونیه در این مدت افزایشی را نشان نداد لکن عیار IgG بر علیه این باکتری (۱۲۸/ ۴۸)۳۴/۵۸٪ افزایش نشان داد که از این میان (۱۲۸/ ۲۲) ۱۵/۸۲٪ تنها در بازگشت عیار افزایش یافته ای را نشان دادند . ضمنا عیار آنتی بادی بر علیه مایکو پلاسما پنومونیه و لژیونلا پنوموفیلا در هر دو مرحله از افزایش چشمگیری بر خوردار نبود.

نتیجه گیری: باکتری پاتوژن غیر معمول کلامیدیا پنومونیه در بین زائرین ایرانی خانه خدامی تواند باعث عفونت تنفسی گردد وبنا براین می بایستی موردتوجه قرار گیرد وسپس با انجام روش های تشخیصی در دسترس و مقایسه حساسیت و ویژگی آنها شیوع واقعی این پاتوژن را در بین زائرین حج تمتع تعیین نمود.

کلید واژه ها: کلامیدیا پنومونیه، مایکو پلاسما پنومونیه و لژیو نلا پنوموفیلا، عفونتهای تنفسی, زائرین، عیار آنتی بادی

مقدمه :

همه ساله در آغاز انجام مناسک حج تمتع نزدیک به ۳ میلیون نفر از زائرین کشورهای اسلامی عازم کشور عربستان سعودی می شوند (۱) . تجمع این جمعیت عظیم درشهر های مکه و مدینه ،آن هم در یک منطقه محدود باعث انتقال سریع عفونت ها از جمله عفونتهای دستگاه تنفسی می شود (۲،۳). گزارشهای موجود حکایت از ابتلاء ۶۲ تا ۳۶ درصد از حجاج به بیماریهای تنفسی شبه آنفلونزا در محل و ۲۵/۶ درصد از حجاج پس از بازگشت به موطن خود دارد(۴،۵). شیوع این حجم از عفونتهای تنفسی علی رغم اقدامات پیشگیرانه ای که طی سالهای اخیر صورت گرفته دلیل بر این است که هنوز اطلاعات کافی در خصوص سبب شناسی عفونتهای مزبور

در اختیار نیست، تا براساس آن بتوان در جهت کنترل، پیشگیری و درمان این بیماریها اقدامات موثری را انجام داد.

در حال حاضر نزدیک به۵۰ درصد از پاتوژنهای موثر در عفونت های تنفسی به طور معمول تعیین هویت نمی شوند (به ویژه هنگامی که پاتوژن های غیر تیپیک در این گونه بیماریها درگیر باشند)، به همین دلیل اقدامات پیشگیرانه و درمانی جاری پاسخگوی نیازهای فعلی نبوده و استفاده از روش های استاندارد جهت تشخیص اینگونه عفونت ها امری ضروری و اجتناب ناپذیراست. در یک مطالعه که در آسیا صورت گرفته است تشخیص عفونت های تنفسی ناشی از پاتوژن های غیر تیپیک بر مبنای روشهای سرولوژیک بر روی ۱۳۷۴ بیمار و در دو مرحله حاد و نقاهت نشان داد که ۲۳/۵ درصد از اینگونه عفونت ها ناشی از باکتریهای غیر تیپیک مایکوپلاسما پنومونیه (۱۲/۲درصد) ، کلامیدیا پنومونیه (۴/۷درصد) و لژیونلا پنوموفیلا (۶/۶درصد) بوده است و عیار پایدار و افزایش یافته ای از آنتی بادیهای اختصاصی مایکوپلاسما پنومونیه (۱۰/۲ درصد)،کلامیدیا پنومونیه (۴/۸ درصد) و لژیو نلا پنوموفیلا (۱۸/۹ درصد) بر علیه این باکتریها در سرم خون بیماران دلالت بر تماس اخیر افراد با باکتریهای مذکور می باشد (۶). با این پیش فرض و به منظور بررسی تغییرات عیار آنتی بادیهای اختصاصی بر علیه باکتریهای آتیپیک یعنی مایکوپلاسما پنومونیه، کلامیدیا پنومونیه و لژیو نلا پنوموفیلا ، سرم زائرین سالم که هیچگونه شواهدی دال بر بیماری تنفسی نداشتند قبل از عزیمت به حج تمتع و سپس بعد از مراجعت از سفر حج جمع آوری و بر روی آن آزمایش سرولوژیک بعمل آمد تا نقش این عوامل بیماریزا در عفونتهای تنفسی حجاج ایرانی روشن گردد .

مواد و روش ها:

نمونه های سرمی قبل و بعد از مراجعت زائرین از حج جهت سنجش عیار سرمی آنتی بادی های IgM,IgG ایجاد شده برعلیه مایکو پلاسما پنومونیه به روش الایزا و با استفاده از کیتهای شرکت IBL(RE 56671 IgM,RE 6681 IgG) موردبررسی قرار گرفت، سپس نتایج بهمراه کنترل های مثبت و منفی مقایسه و یادداشت گردید

(Positive = >12u / ml Negative < 8 u / ml).

همچنین عیار سرمی آنتی باد های IgM,IgG بر علیه کلامیدیا پنومونیه نیز به روش الایزا و با استفاده از کیت های شرکت IBL (RE 57051 IgM,RE 5704 IgG) مورد سنجش قرار گرفته و سپس نتایج بهمراه کنترل های مثبت و منفی مقایسه و یادداشت گردید (Positive = >11u / ml , Negative < 9 u / ml) .

ضمنا به منظور بررسی عیار آنتی بادی های بر علیه سرو گروپهای۱و ۲،۴،۵،۶،۸ لژیونلا پنوموفیلا از لامهای شرکت (code: FOCUS IF0950) به روش ایمونوفلورسانس غیر مستقیم استفاده گردید ، سپس نتایج ۱+ تا ۴+ در مقایسه با کنترل های مثبت و منفی قرائت و یادداشت گردید.

یافته ها:

شیوع عیار آنتی بادی های اختصاصیIgM,IgG برعلیه مایکوپلاسما پنومونیه در۱۲۸ نمونه سرمی زا ئرین در دو مرحله رفت و برگشت از سفر حج از تغییر قابل ملاحظه ای بر خوردار نبود.

شیوع عیار آنتی بادی اختصاصیIgM بر علیه کلامیدیا پنومونیه در ۱۲۸ نمونه سرمی زا ئرین در دو مرحله رفت و برگشت تغییر قابل ملاحظه ای را نشان نداد(جدول۱)، لکن شیوع عیار آنتی بادی اختصاصیIgG بر علیه کلامیدیا پنومونیه در دو مرحله رفت و برگشت در(۴۸/۱۲۸) ۵۸ / ۳۴درصد از نمونه هاي سرمی عیاری بالای u/ml ۱۱ و در (۱۵/۱۲۸)۱۰/۷۷ درصد از نمونه های سرمی عیاری بین u/ml۱۱-۹ و در(۱۲۸/ ۶۵)۵۴/۶۵ درصد از نمونه های سرمی عیاری زیر u/ml۹را نشان داد(جدول ۲). نتایج فوق دلالت بر این دارد که(۲۲/۱۲۸) ۱۵/۸۲درصد نفر از زائرین اخیراً دچار عفونت ناشی از کلامیدیا پنومونیه گردیده اندو عیار سرمی آنتی بادی اختصاصیIgG در آنها ۴ برابر یا بیشتر از عیار سرمی قبل از عزیمت آنها به سفر حج بوده است. ضمنا (۱۳/۱۲۸) ۳۵/ ۹ درصد از آنها عیار سرمی بین u/ml ۱۱-۹ و (۶۱/۱۲۸) ۴۳/۸۸ درصد از ایشان عیار زیر u/ml ۹ را نشان داد که درمورد اخیر بیانگر عدم تغییر عیار سرمی آنها در این سفر بوده است.

شیوع عیار آنتی بادی های بر علیه زیر گروه ۱ وسایر زیر گروه های لژیونلا پنوموفیلا نمونه سرمی زا ئرین در دو مرحله رفت و برگشت از تغییر قابل ملاحظه ای برخوردار نبود و بیانگر عدم ابتلاء اخیر آنها به عفونت ناشی از لژیونلاپنوموفیلا می باشد(جدول۳و۴).

جدول شماره ۱- مقایسه عیارسرمی آنتی بادی IgM کلامید یا پنومونیه قبل از عزیمت و بعد از مراجعت زائرین ازحج‌تمتـــع

بعد / قبل	عیار u/ml ۱۱ یا بیشتر		عیار زیر ۹ u/ml		جمع	
	تعداد	(درصد)	تعداد	(درصد)	تعداد	(درصد)
عیار u/ml ۱۱ یا بیشتر	-۰-	(-۰-)	-۰-	(-۰ -)	-۰-	(-۰-)
عیار زیر ۹ u/ml	۱	(۰/۷۹)	۱۲۷	(۹۹/۲۱)	۱۲۸	(۱۰۰)
جمع	۱	(۰/۷۹)	۱۲۷	(۹۹/۲۱)	۱۲۸	(۱۰۰)

جدول شماره۲- مقایسه عیارسرمی آنتی بادیIg G کلامید یا پنومونیه قبل از عزیمت و بعد از مراجعت زائرین ازحج تمتع

بعد / قبل	عیار ۱۱u/ml یا بیشتر		عیار بین ۹ -۱۰/۹۹ u/ml		عیار زیرu/ml ۹		جمع
	تعداد	(درصد)	تعداد	(درصد)	تعداد	(درصد)	تعداد (درصد)
عیارu/ml ۱۱ یا بیشتر	۲۲	(۱۵/۸۲)	۱	(۰/۷۱)	۱	(۰/۹۳)	۲۴ (۲۵/۱۵)
عیار بین u/ml ۹-۱۰/۹۹	٤	(۲/۹٤)	۱	(۰/۷۱)	۳	(۲/۱۵)	۸ (۵/۸۰)
عیار زیرu/ml۹	۲۲	(۱۵/۸۲)	۱۳	(۹/۳۵)	۶۱	(۴۳/۸۸)	۹۶ (۶۹/۰۵)
جمع	۴۸	(۳۴/۵۸)	۱۵	(۱۰/۷۷)	۶۵	(۵۴/۶۵)	۱۲۸ (۱۰۰)

جدول شماره ۳- مقایسه عیارسرمی آنتی بادی زیر گروه ۱ لژیونلا پنوموفیلا قبل از عزیمت و بعد ازمراجعت زائرین ازحج تمتع

قبل \ بعد	عیار ۴ برابر یا بیشت تعداد (درصد)	عیار زیر ۴ برابر تعداد (درصد)	جمع تعداد (درصد)
عیار ۴ برابر یا بیشتر	-۰- (-۰-)	۱ (۰/۸۱)	۱ (۰/۸۱)
عیار زیر ۴ برابر	۶ (۴/۶۸)	۱۲۱ (۹۴/۵۱)	۱۲۷ (۹۹/۱۹)
جمع	۶ (۴/۶۸)	۱۲۲ (۹۵/۳۲)	۱۲۸ (۱۰۰)

جدول شماره۴- مقایسه عیارسرمی آنتی بادی سایر زیر گروههای لژیونلا پنوموفیلا قبل ازعزیمت و بعد از مراجعت زائرین از حج تمتع

قبل \ بعد	عیار ۴ برابر یا بیشتر تعداد (درصد)	عیار زیر ۴ برابر تعداد (درصد)	جمع تعداد (درصد)
عیار ۴ برابر یا بیشتر	۳ (۲/۳۵)	۶ (۴/۶۸)	۹ (۷/۰۳)
عیار زیر ۴ برابر	۱۱ (۸/۵۹)	۱۰۸ (۸۴/۳۸)	۱۱۹ (۹۲/۹۷)
جمع	۱۴ (۱۰/۹۴)	۱۱۴ (۸۹/۰۶)	۱۲۸ (۱۰۰)

بحث:

عفونت های تنفسی در بین زائرین خانه خدا که همه ساله جهت انجام مناسک حج تمتع عازم عربستان سعودی می گردند علی رغم اقدامات پیشگیرانه و توصیه های پزشکی و بهداشتی که از سوی مسئولین ذیربط صور ت می گیرد ، بدلیل عدم اطلاعات کافی از علل شیوع این عفونتها باعث میگردد تعداد قابل توجهی از زائرین در حین انجام مناسک د چار بیماریهای تنفسی شوند به طوریکه آنها را در انجام اعمال حج تمتع ناتوان کرده و حتی مدتها پس از مراجعت از سفر از عوارض ناشی از این بیماریها رنج برده و چه بسا باعث انتقال عفونت های مزبور به سایر اعضای خانواده گردند، در مطالعه ای که اخیرا بر روی مراجعین به دو بیمارستان شهر مکه صورت گرفت ، بیماریهای تنفسی (۵۷ درصد) معمولی ترین علت مراجعت زائرین به این دو بیمارستان بوده است که از این میان ۳۹ درصد دچار پنومونی بودند ، واین در حا لیست که تنها ۳۰ درصد

از آنها کشت میکربی نمونه خلط آنها مثبت گزارش شده است و مابقی منفی بوده است (۷).

بنابراین با توجه به میزان بالای کشت منفی (۷۰ درصد) ، این احتمال وجود داشته است که تعداد قابل توجهی از بیماران با علایم تنفسی به یکی از پاتوژن های آتیپیک آلوده گردیده اند ، کمااینکه در مطالعه دیگر ۲۳/۵ درصد از این گونه عفونت ها را ناشی از باکتریهای آتیپیک می دانند. لذا به منظور بررسی نقش پاتوژن های آتیپیک (مایکوپلاسما پنومونیه، کلامیدیا پنومونیه، لژیونلا پنومونیه) در بروز این عفونت ها مطالعه مزبور انجام گرفت .

دراین مطالعه عیار سرمی آنتی بادیهای اختصاصی IgM ,IgG برعلیه مایکو پلاسما پنومونیه در دو مرحله رفت و برگشت زائرین از سفر حج مورد ارزیابی قرار گرفت و عیار آنتی بادی اختصاصیIgM (۱۲۴/۱۲۸) ۹۶ درصد از زائرین زیرu/ml ۸ باقی مانده است و تغییر قابل ملاحظه ای را نشان نمی دهد ، در حالیکه عیارIgM معمولا ۱۰تا۷ روز بعد از عفونت بایستی افزایش نشان دهد . در مورد عیارIgG که در فاز حاد بیماری افزایش نمی یابد و معمولا سه هفته بعد از شروع عفونت ظاهر میگردد نیز مشاهده می شود که عیار (۱۲۷/۱۲۸) ۹۹ درصد از زائرین زیرu/ml ۸ می باشد وتنها کمی بیش از یک درصد (۱/۱۲۸) از زائرین عیار u/ml ۱۲ را نشان می دهد که با توجه به پایین بودن درصد آن ،تغییر مزبور قابل توجه نبوده و بیانگر آن است که به احتمال زیاد این باکتری نقش چندانی در بروز عفونت های تنفسی زائرین در طی مناسک حج ندارد (۸).

کلامیدیا پنومونیه یکی دیگر از عوامل سببی بیمارهای تنفسی محسوب میشود و در بین پنومونی های کسب شده از جامعه ۱۲تا ۱۱ درصد گزارش شده است (۹).دراین تحقیق عیار سرمی آنتی بادیهای اختصاصیIgM,IgG کلامیدیا پنومونیه در دو مرحله رفت و برگشت زائرین از سفر حج مورد ارزیابی قرار گرفت به طوریکه عیار آنتی بادی اختصاصیIgM در (۱۲۷/۱۲۸) ۹۹ درصد از زائرین زیرu/ml ۹ باقی مانده است و تغییر قابل ملاحظه ای را نشان نمی دهد و تنها (۱/۱۲۸) یک درصد از زائرین عیار بالای u/ml۱۱را نشان می دهد که با توجه به پایین بودن درصد آن، تغییر مزبور قابل توجه نمی باشد ، ضمن آنکه به این نکته نیز باید اشاره نمود که عیارIgM در افراد بالغ ارزش تشخیصی ندارد(۹). درمورد عیار آنتی بادی اختصاصیIgG کلامیدیا پنومونیه که در فاز حاد بیماری افزایش می یابد و برای مدت ۲تا۱ ماه تداوم می یابد بایستی اشاره نمود که عیار سرمی (۴۸/۱۲۸) ۳۴/۵۸درصد از زائرین درمجموع رفت و برگشت بالای u/ml۱۱ بود که عیار سرمی مثبت تلقی میگرد د واین درحالیست که (۱۵/۱۲۸) ۱۰/۷۷درصد از آنها عیاری بینu/ml ۱۱-۹ و (۶۵/۱۲۸) ۵۴/۶۵ درصد از زائرین عیار سرمی زیر u/ml ۹ را نشان دادند که عیار سرمی منفی تلقی می گردد. طبق این اطلاعات (۲۲/۹۶) ۸۲/ ۱۵ درصد از افراد در حین سفرحج دچار عفونت ناشی از کلامیدیا پنومونیه شده اند و (۱۳/۹۶) ۹/۳۵ درصد از زائرین در برگشت عیارسرمی بینابین را نشان داده اند واین در حالی است که (۶۱/۹۶) ۴۳/۸۸ درصد از زائرین چه در مرحله رفت و چه درمرحله برگشت تغییری در عیار آنتی بادی اختصاصی IgG کلامیدیا پنومونیه را نشان نمی دهند. بر اساس تجزیه وتحلیل آماری که با استفاده از نرم افزارSPSS و آزمون McNemar و احتمال (P<0/0001) صورت گرفت عیار سرمی آنتی بادی اختصاصیIgG کلامیدیا پنومونیه در زائرین پس از مراجعت از سفر حج نسبت به قبل از سفر از اختلاف معنی داری برخوردار است.ضمنا در یک مطالعه سرواپیدمیولوژیک که جهت بررسی شیوع آنتی بادیهای اختصاصی بر علیه کلامیدیا پنومونیه صورت گرفت ، درصد شیوع عفونت ناشی از این باکتری را ۴/۸ درصد گزارش می نماید(۱۰) و این در حالیست که در مطالعه ما این درصد به ۱۵/۸۲ افزایش یافته است ، که این می تواند به نقش بارز کلامیدیا پنومونیه در مقایسه با سایر باکتریهای آتیپیک در بروز عفونت های تنفسی در ایام حج اهمیت ویژه ای بخشد.

در خصوص لژیونلا پنوموفیلا نزدیک به ۶/۶ درصد از عفونت های تنفسی را به خود اختصاص می دهد. در این تحقیق عیار سرمی آنتی بادیها ی اختصاصی بر علیه زیر گروه ۱ و سایر زیرگروههای این با کتری در سرم زائرین در دو مرحله رفت و برگشت مورد ارزیابی قرار گرفت ، عیار آنتی بادیهای اختصاصی زیر گروه ۱ (۶/۱۲۸) ۶۸ / ۴ درصد از زائرین درمرحله برگشت ۴ برابر میزان آن در مرحله رفت بوده است . همچنین (۱۲۲/۱۲۸)۳۲ /۹۵ درصد از زائرین تغییر عمده ای را نشان نمی دهند . ضمنا در مورد عیار سرمی آنتی بادیهای اختصاصی بر علیه زیر گروههای ۲،۴،۵،۶،۸ لژیونلا پنوموفیلا می توان بیان داشت که عیار سرمی آنتی بادیهای اختصاصی بر علیه سایر گروههای لژیونلا پنوموفیلا در (۱۴/۱۲۸) ۱۰/۹۴ درصد از زائرین ۴برابر شده است و این در حالیست که (۱۱۴/۱۲۸)۸۹/۰۶ درصد از زائرین عیار سرمی افزایش یافته ای را نشان نمی دهند .

نتیجه گیری :

بنابراین براساس تجزیه و تحلیل آمارموجود می توان بیان داشت که لژیونلا پنوموفیلا نقش عمده ای در بروز عفونتهای تنفسی زائرین در ایام حج نداشته است.

تقدیروتشکر: در اینجا وظیفه خود می دانیم تا از تلاشهای ریاست محترم هیئت پزشکی سازمان حج و زیارت و کلیه عواملی که در تهیه و تامین مواد و اقلام مورد نیاز این طرح مارا یاری دادند و ضمنا از جناب آقای دکتر میثمی که مشاوره آمار این طرح بودند تشکر نماییم ، همچنین جا دارد از زنده یاد مرحوم مصطفی حاج محمد که در انتقال نمونه های سرمی زائرین به گروه میکرب شناسی دانشکده پزشکی تلاش وافری از خود نشان داد یادی نموده و برای آن مرحوم از خداوند متعال علوُ درجات مسئلت نماییم .

فهرست مراجع:

1. Tariq A Madani, Ali M Albarrak, Mohammad A Alhazmi, Tarik A Alazraqi, Abdulahakeem O Althaqafi and Abdulrahman H Ishaq. Steady improvement of infection control services in six community hospitals in Makkah following annual audits during Hajj for four consecutive years ,BMC *Infectious Diseases* 2006, 6:135 doi:10.1186/1471-2334-6-135
2. Balkhy HH, Memesish ZA et al.Influenza a common viral infection among Hajj pilgrims: time for routine surveillance and vaccination. *J Travel Med*. 2004 Mar-Apr;11(2):82-6.es
3. Annelies Wilder-Smith, Timothy M S Barkham. Acquisition of W135 meningococcal carriage in Hajj pilgrims and transmission to household contacts: prospective study.*BMJ*, Aug 2002; 325: 365 - 366 ; doi:10.1136/bmj.325.7360.365
4. Haitham El Bashir,*Elizabeth Haworth,†Maria Zambon ,Shuja Shafi,Jane Zuckerman,and Robert Booy*, Influenza among U.K. Pilgrims to Hajj, 2003. Emerging Infectious Diseases • www.cdc.gov/eid • Vol. 10, No. 10, October 2004
5. S Al-Asmary, AS Al-Shehri, A Abou-Zeid, M Abdel. Acute respiratory tract infections among Hajj medical mission personnel, Saudi Arabia Copyright © 2006 International Society for Infectious Diseases Published by El sevier Ltd.
6. F. Blasi . Atypical pathogens and respiratory tract infection. *Eur Respir J* 2004 24: 171-182.s
7. Annemarie Ferwerda, Henriëtte A. Moll, Ronald de Groot. Respiratory tract infections by Mycoplasma pneumoniae in children . *Eur j pediatr (*2001) 160: 483-491
8. SM Schmidt, CE Müller, M Krechting, H Wiersbitzky. Chlamydia pneumoniae carriage and infection in Hospitalized children with Respiratory Tract Diseases . *infection* 31. 2003. NO.6
9. PATRICK R.MURRAY ,Medical Microbiology, 4th edition,2002, Mosby,Page412

مجله میکروب شناسی پزشکی ایران

سال ۱ شماره ۱ بهار ۱۳۸۶، صفحات ۶۱ – ۶۶

مزایای تشخیص سریع مننژیت باکتریایی به‌روش مولکولی در مقایسه با کشت و مشاهده مستقیم میکروسکوپی مایع نخاع

رمضانعلی عطایی*[۱و۳]، علی مهرابی توانا[۲]، زهرا سفیری[۳]، علی کرمی[۳]، مرتضی ایزدی[۲]، سید محمد جواد حسینی[۳]

۱) گروه میکروب شناسی، دانشکدهٔ پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی بقیه‌ا...«عج»

۲) گروه میکروب شناسی و مرکز تحقیقات بهداشت نظامی، دانشکدهٔ پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی بقیه‌ا...«عج»

۳) مرکز تحقیقات بیولوژی مولکولی، دانشگاه علوم پزشکی بقیه‌ا...«عج»

نویسنده رابط: رمضانعلی عطایی، گروه میکروب شناسی و مرکز تحقیقات بیولوژی مولکولی دانشکدهٔ پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی بقیه‌ا...«عج»

تاریخ دریافت مقاله: ۸۶/۳/۲۰ تاریخ پذیرش مقاله: ۸۶/۴/۳

چکیده:

زمینه و اهداف: مننژیت حاد باکتریال یک عامل مهم مرگ و میر باقی مانده که در افراد نجات یافته، ممکن است با ایجاد ضایعات عصبی دایمی همراه گردد. لذا، تشخیص سریع اتیولوژی مننژیت باکتریال و درمان مناسب آن یک امر حیاتی می‌باشد. از این رو، هدف این تحقیق مقایسه روش مولکولی MultiplexPCR با روش‌های باکتریولوژیک و نیز مشاهده مستقیم مایع نخاع جهت تشخیص سریع باکتری‌های شایع عامل مننژیت می‌باشد.

روش بررسی: در این تحقیق، ۱۵۰ نمونه مایع نخاع بیماران مشکوک به‌مننژیت را با استفاده از PCR هدف‌مند شده با پرایمرهای عمومی بر اساس ژن *16S rRNA* و نیز پرایمرهای اختصاصی جهت باکتری‌های نیسریا مننژیتیدیس، استرپتوکوکوس پنومونیه و هموفیلوس اینفلونزا استفاده گردید. همچنین، سایر روش‌های باکتریولوژیک و نیز میکروسکوپی مورد بررسی قرار گرفت.

یافته ها: استفاده از چند روش تشخیصی همزمان، امکان تشخیص سریع اتیولوژی باکتریال را در افراد مبتلا به‌مننژیت مهیا نمود. چنانچه با روش مولکولی تشخیص اختصاصی از ۱۵۰ نمونه مایع نخاع ۹ مورد نیسریا مننژیتیدیس تأیید گردید. در حالی که کشت باکتریولوژیک تنها در ۶ مورد نیسریا مننژیتیدیس را نشان داد ولی مشاهده لام مرطوب وجود ۸ مورد مننگوکک را تأیید نمود.

نتیجه گیری: نتایج این تحقیق نشان داد، روش‌های مولکولی PCR یگانه و چندگانه برای تشخیص عامل مننژیت باکتریایی از کشت باکتریولوژیک و نیز مشاهده مستقیم از حساسیت بیشتری برخوردار است. با این حال، قضاوت بر اساس مشاهده میکروسکوپی هر چند کیفی است. ولی مشاهده مستقیم مرفولوژی باکتری و نیز سایر شواهد در نمونه مایع نخاع علاوه بر راهنمایی جهت طراحی پروتکل مناسب تشخیص قطعی و امکان انتخاب آنتی‌بیوتیک مناسب را جهت درمان نیز فراهم می‌نماید.

کلید واژه‌ها: مایع نخاع، مننژیت باکتریایی، تشخیص سریع و MultiplexPCR

مقدمه:

مننژیت باکتریایی یکی از عفونت‌های تهدید کننده حیات انسان در تمام سنین است و در صورتی که به‌موقع تشخیص داده نشود و به‌طور مناسب درمان نگردد؛ پیامد آن غیر قابل جبران است(۱، ۲ و ۳). هر چند کشت باکتریولوژیک و جدا سازی عامل بیماری از مایع نخاع از دقیق ترین روش‌های تشخیص بشمار می‌آید ولی به ۱۸ تا ۲۴ ساعت زمان نیاز دارد. به‌علاوه مصرف آنتی بیوتیک مانع رشد و جدا سازی باکتری می‌گردد (۴). از طرفی بنا به‌دلایل متعدد، تعداد کمی از موارد مننژیت باکتریال با این روش قابل تشخیص است (۵). روش‌های تشخیص مولکولی پیشرفته از جمله PCR هر چند مفید ولی بنا به دلایل متعدد از جمله هزینه بالا و دانش فنی مورد نیاز برای بسیاری از آزمایشگاه‌ها امکان پذیر نیست (۶). به‌طور

مرسوم، مشاهده میکروسکوپی نمونه مایع نخاع رنگ شده با روش گرم امکان تشخیص اولیه را مهیا کرده است ولی تعداد کم باکتری در نمونه، تجربه فردی وحساسیت کم و نیز وجود الیاف پروتئینی در مایع نخاع از ارزش این روش نیز کاسته است. در هر حال حساسیت هر یک از این روش‌ها بین ۶۰ تا ۹۰ درصد گزارش شده است (۷ و ۸). و حساسیت مجموع آنها ۷۵ درصد تخمین زده می‌شود. هدف این تحقیق مقایسه روش مولکولی MultiplexPCR با روش‌های باکتریولوژیک و نیز مشاهده مستقیم مایع نخاع جهت تشخیص سریع عوامل شایع باکتریایی منتژیت می‌باشد.

مواد و روش ها:

در این تحقیق، محیط کشت پایه تریپتیکیز سوی‌آگار، و نیز تایر مارتین آگار بر اساس دستورالعل کارخانه سازنده تهیه و پس از استریل کردن آنها با اتوکلاو ۱۲۱ درجه سانتی گراد به‌مدت ۱۵ دقیقه، در شرایط کاملا آسپتیک: افزودنی‌هایی به‌این قرار به‌آنها اضافه شد: سرم گوساله به‌نسبت ۵ درصد؛ سیستئین هیدروکلراید به‌نسبت ۰/۰۲ درصد؛ عصاره مخمر به‌نسبت ۵ گرم در لیتر؛ گلوکز منوهیدرات ۵ گرم در لیتر.

پس از کنترل عدم آلودگی، محیط‌ها در یخچال ۵ تا ۱۰ درجه سانتی گراد قرار داده و در موقع لزوم استفاده گردید. برای تهیه محیط کشت شوکولاتی، به‌محیط فوق، پس از استریل نمودن آن و در دمای ۸۵ درجه سانتی‌گراد به‌نسبت ۱۰ درصد خون دفیبرینه گوسفند اضافه شد.

جمع آوری نمونهCSF و بررسی باکتریوژیک آنها

از مهر ماه ۱۳۸۳ لغایت مهر ۱۳۸۵، تعداد ۱۵۰ نمونه مایع نخاع بیمار مبتلا به‌منتژیت مراجعه کننده به‌بیمارستان‌های مورد نظر در تهران توسط پزشک متخصص جمع آوری شد پس از تهیه لام مستقیم (لام مرطوب و اسمیر رنگ شده) و نیز کشت باکتریولوژیک در محیط‌های روتین و نیز در محیط‌های اختصاصی، قسمتی از نمونه‌های ارسالی را به‌آزمایشگاه تحقیقاتی منتقل و مورد بررسی بیشتر قرار گرفتند. به‌این ترتیب، از هر نمونه یک اسمیر مرطوب و یک اسمیر خشک تهیه شد. اسمیر مرطوب مستقیماً با عدسی ۱۰۰ بررسی گردید. اسمیر خشک را رنگ‌آمیزی ساده (بلودو متیلن) و نیز رنگ‌آمیزی گرم انجام و با دقت و حوصله مورد بررسی قرار گرفت. به‌طوری که هر لام حداقل ۱۰ دقیقه تحت بررسی قرار داشت. در صورتی که در لام مستقیم سلول پلی مورف یا باکتری مشاهده نمی‌شد. نمونه را به‌مدت ۵ دقیقه با دور g × ۱۰۰۰۰ و دمای آزمایشگاه سانتریفیوژ و از رسوب آن کشت باکتریولوژیک انجام و اسمیر نیز تهیه و بررسی می‌شد(۹).

انتخاب پرایمر

پس از بررسی منابعی که از PCR برای تشخیص عوامل شایع منتژیت باکتریایی استفاده کرده بودند، تمام ژن‌ها و پرایمرهایی که تا کنون استفاده شده بودند، مورد بررسی قرار گرفت. از بین آنها پرایمرهایی که تعداد بیشتری از گروه‌های سرمی نیسریا منتژیتیدیس، استرپتوکوکوس پنومونیه و هموفیلوس اینفلونزا را شناسایی کرده بودند، انتخاب گردید. همچنین، پرایمر عمومی که بر اساس ژن محافظت شده *16S rRNA* انتخاب و مورد بررسی قرار گرفتند (۱۰، ۱۱). بر اساس میزان حساسیت و اختصاصیت پرایمرها و نتایج آنالیز آنها با نرم افزار ملکولی BLAST کارآیی پرایمرها تعیین گردید. به این ترتیب پرایمرهایی با ترادف های مشخص انتخاب (جدول ۱) و مورد بررسی قرار گرفت. این پرایمرها توسط شرکت سیناژن ساخته شد.

جدول۱: ترادف پرایمرهای عمومی و اختصاصی استفاده شده در این تحقیق

PRIMER	position 16srRNA sequence of E.coli(region)	(Sequence 5'-3')
U3	۵۰۹-۵۳۳	AACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAA
NM	۸۳۱-۸۴۷	TGTTGGGCAACCTGATTG
HI	۹۹۸-۱۰۱۵	CCTAAGAAGAGCTCAGAG
STREP	۱۲۴۶-۱۲۶۳	GTACAACGAGTCGCAAGC
U8	۱۵۴۱-۱۵۱۷	AAGGAGGTGATCCAGCCGCAGGTTC

استخراج ژنوم: برای استخراج ژنوم از روش Boom و همکاران با کمی تغییر بهره گرفته شد (۱۲و ۱۳). بهاین ترتیب که برای set up نمودن آزمایش PCR ابتداء چند کلنی از باکتری‌های استاندارد را به۱ میلی لیتر سرم فیزیولوژی وارد نموده و سانتریفیوژ گردید (۵۰۰۰ دور بهمدت ۵ دقیقه)، بهروسوب حاصل ۵۰۰ میکرولیتر بافر Salt Tris EDTA افزوده و پس از ۱۰ دقیقه و مخلوط نمودن آن، ۱۸۰ میکرولیتر SDS دو درصد بهآن اضافه گردید. پس از آن ۳۷۵ میکرولیتر استات سدیم بهآن افزوده و ۱۰ بار تکان شدید داده شد. سپس در ٤ درجهسانتی‌گراد سانتریفیوژ شده و بهمحلول رویی ۷۵۰ میکرولیتر ایزوپروپانول اضافه و بهمدت ۲۰ دقیقه در یخچال منهای ۲۰ درجه نگهداری و پس از آن سانتریفیوژ گردید (۱۵۰۰۰ دور بهمدت ۲۰ دقیقه و دمای ٤ درجهسانتی‌گراد). بهروسوب حاصل ۳۷۵ میکرولیتر اتانل ۷۰ درصد افزوده و بهخوبی مخلوط گردید و بهمدت ۱۰ دقیقه با دور ۱۵۰۰۰ سانتریفیوژ شد. بهروسوب حاصل ۲۵ میکرولیتر بافر TE اضافه کرده و جهت انجام PCR استفاده شد.

بهینه سازی مواد لازم برای واکنش PCR

برای رسیدن بهاین هدف چند بار فرآیند PCR با ژنوم سویه‌های استاندارد انجام شد و در هر مرحله یکی از غلظت‌های مواد اولیه (پرایمرها ،MgCl2، dNTP و آنزیم Taq پلی مراز) استفاده شد و در نهایت مناسب‌ترین مقادیر مواد لازم برای انجام PCR انتخاب گردیدند. دمای اتصال پرایمرها، پروفایل‌های حرارتی و زمان واکنش تغییر داده شد تا بهترین شرایط PCR فراهم گردد. جهت بهینه سازی دمای اتصال پرایمرها (Annealing) از درجه حرارت‌های ٥٦ ، ٥٧ و ٥٨/٨ ، ٥٩/٩ ، ٦١/٢ ، ٦٢/٧ ،٦٣/٢ درجه سانتی‌گراد استفاده شد (۱۴).

انجام PCR نمونه‌های CSF

پس از استخراج ژنومی از نمونه‌های مایع نخاع بیماران مبتلا بهمننژیت طبق برنامه (پروتکل و پروفایل حرارتی بهینه شده نهایی) واکنش PCR با هر یک از آنها انجام شد. همچنین، از ژل آگارز دو درصد برای الکتروفورز محصولات PCR استفاده گردید. روش تعیین مقدار DNA بر اساس میزان حساسیت رنگ اتیدیوم بروماید: با توجه بهاین که توانایی روش الکتروفورز در رنگ آمیزی با اتیدیوم بروماید در تعیین DNA در بهترین شرایط یک نانوگرم می‌باشد (۱۵). لذا نمونه خالص شده از محیط کشت بهصورت رقت سریالی ۱/۲ تا ۱/۸۰رقیق گردید و ضعیف ترین باند انتخاب شد.

یافته ها:

نتایج مشاهده مستقیم نمونه‌های مایع نخاع در لام مرطوب و لام رنگ شده

طی دو سال؛ یعنی از مهرماه ۱۳۸۳ لغایت مهرماه ۱۳۸۵ مجموعاً ۱۵۰ نمونه مایع نخاع بیماران با علایم مننژیت بهمراکز اورژانس بیمارستان‌های مورد نظر ارجاع شد و از نظر مولکولی و باکتریولوژیک مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد، مشاهده لام مستقیم تهیه شده از مایع نخاع بیمار مبتلا بهمننژیت، چه بهصورت مرطوب و چه بهصورت رنگ شده؛ سلول‌های باکتری و نیز سلول‌های پلی‌مورف قابل مشاهده هستند.

نتایج کشت باکتریولوژیک

تلقیح ۱۰۰ میکرولیتر از مایع نخاع با کدورت قابل مشاهده و یا رسوب حاصل از سانتریفیوژ بهمحیط‌های آگار شوکولاتی با پایه مولر هینتون و نیز تاریر مارتین تقویت شده با خون گوسفند یا سرم گوساله، گلوکز، عصاره مخمر و نیز سیستئین هیدروکلراید و گرمخانه‌گذاری در شرایط ۵ – ۳ درصد گاز کربنیک و دمای ۳۷ – ۳٦ درجه سانتی‌گراد، پس از ٢٤ ساعت در مقایسه با سایر محیط‌ها با رشد مطلوب همراه بود. آنالیز نتایج کشت باکتریولوژیک نشان داد از ۱۵۰ نمونه مایع نخاع بررسی شده ٤٣ مورد کشت مثبت باکتریولوژیک تأیید گردید. فراوانی باکتری‌های جدا شده به ترتیب شامل: *Streptococcus pneumoniae* و سایر کوکوسی‌های گرم مثبت (۵۰ درصد)، *Neisseria meningitidis* (۱۱ درصد)، *Haemophilus influenzae* و سایر باکتری‌های گرم منفی (۳۹ درصد) بود.

نتایج بررسی مولکولی

پس از set up کردن روش Multiplex PCR با سویه‌های استاندارد باکتریایی، مناسبت‌ترین غلظت از مواد مصرفی و پروفایل حرارتی بهقرار جدول ۲ و ۳ حاصل گردید.

جدول ۲: مواد مصرفی استاندارد شده مورد نیاز برای انجام Multiplex PCR

Materials	Amount	Final Concentration
dNTP(10 mM)	۰,۷µl	۰,۳۵mM
Primer NM/HI/STREP (20pmol) (Forward)	۰,۸µl	۰,۸µM/L
PrimerU8 (20pmol) (Reverse)	۰,۸µl	۰,۸µM/L
MgCl2 (50 mM)	۰,۸µl	۲ mM
Template(PCR product of U3&U8 genomes *Neisseria meningitides/ Haemophilus influenzae / Streptococcus pneumoniae*)	۱ µl	۱ µl (Concentration 1/1000 of Primery pcr product)
Taq DNA Polymerase (500U)	۰,۷µl	۱,۷۵U
Buffer (10x)	۱,٦ µl	۰,۸x
D.W	۱۳,۶µl	--
Total	۲۰ µl	

جدول۳: پروفایل حرارتی استاندارد شده مورد استفاده

Stage	*Temperature(C °)*	*Time*	*Cycle*
HEAT Denaturation	۹٤	٦Min	۱
Denaturation	۹٤	٦Min	۲٦
Anealing	٦۳	٦Min	
Extention	۷۲	٦Min	
FINAL Extention	۷۲	٦Min	۱

با توجه به اپتیمایز کردن روش مولکولی، نتایج بررسی‌های باکتریولوژیک، مشاهده مستقیم و نیز PCR ۱۵۰ نمونه CSF از نظر موارد منتژیت ناشی از *Neisseria meningitidis* در جدول ٤ خلاصه شده است. چنانچه نشان داده شده است. ۵ نمونه CSF با نتیجه کشت منفی، با PCR از نظر نیسریا منتژیتیدیس مثبت گزارش شد. این در حالی است که تنها ۱ مورد از ۵ مورد در مشاهده مستقیم لام رنگ آمیزی شده با روش گرم مثبت گزارش شد اما با مشاهده لام مرطوب (Wet mount) ، ۸ مورد مثبت گزارش شد.

جدول ٤: نتایج کشت، مشاهده مستقیم و PCR ۱۵۰ نمونه مایع نخاع از نظر منتژیت منگوکوکوسی

شمارهٔ نمونه	مشاهده مستقیم با لام مرطوب	مشاهده لام رنگ‌آمیزی شده	نتیجه کشت باکتریولوژیک	نتیجه واکنش PCR
۱	+	+	+	+
۲	+	+	+	+
۳	+	+	+	+
۴	+	+	+	+
۵	+	+	+	+
۶	+	+	–	+
۷	+	–	–	+
۸	+	–	–	+
۹	–	–	–	+
۱۰	-	-	-	+

از نظر تشخیص باکتری‌های *Streptococcus pneumoniae* و *Haemophilus influenzae* با روش مولکولی و مقایسه آن با کشت باکتریولوژیک و مشاهده مستقیم نتایجی مشابه جدول ۴ حاصل گردید. در مجموع استفاده از روش مولکولی جهت تشخیص عوامل باکتریایی مننژیت حاکی از آن بود که استفاده از پرایمرهای ارایه شده در جدول ۱ وجود سه عامل مهم باکتریایی، یعنی؛ *Neisseria meningitidis* ، *Streptococcus pneumoniae* و *Haemophilus influenzae* در بیش از ۳۰ درصد موارد کشت منفی، وجود ژنوم باکتریایی در نمونه‌های مایع نخاع تأیید گردید.

بحث :

در این تحقیق که در خلال دو سال انجام شد. ۱۵۰ نمونه مایع نخاع از بیماران با محدوده سنی ۱٦ تا ۷۵ سال بررسی گردید. با بهینه سازی محیط کشت، در ٤۳ مورد (۲۸/٦ درصد) رشد باکتری (انواع باکتری گرم مثبت و گرم منفی) مثبت و ۱۰۷ موردکشت منفی گزارش گردید. در حالی که با PCR در ۶۷ مورد از نمونه‌های مایع نخاع افراد مبتلا به مننژیت وجود ژنوم باکتری تأیید و در ۸۳ مورد وجود ژنوم باکتری تأیید نشد. بر اساس مشاهده مستقیم لام مرطوب ۵۲ مورد وجود باکتری تایید گردید. به‌علاوه بر اساس لام رنگ آمیزی گرم در ٤۸ مورد از نمونه‌های مایع نخاع وجود باکتری اثبات گردید. هر چند در لام مستقیم امکان تشخیص نوع باکتری وجود ندارد ولی در هر حال تایید کننده اتیولوژی باکتریایی و راهنمای مناسبی برای شروع قطعی درمان ضد باکتریایی است. از بین باکتری‌های جدا شده تنها ۵ مورد نایسریا منژیتیدیس جدا گردید. این درحالی است که در لام مرطوب ۸ مورد و در لام رنگ آمیزی گرم در ٦ مورد وجود نایسریا اثبات گردید. در حالی که بکار بردن پرایمر اختصاصی نایسریا منژیتیدیس و انجام PCR وجود ۱۰ مورد نایسریا در نمونه‌های مایع نخاع تشخیص داده شد. هر چند نمی‌توان با این تعداد نمونه به‌طور قطع قضاوت نمود ولی این نتایج بدان معناست که استفاده از روش‌های مولکولی حساس تر و دقیق تر از روش‌های مرسوم باکتریولوژیک است. به‌علاوه استفاده از دانش فنی افراد و بکار بردن لام مرطوب بر حساسیت تشخیص‌های باکتریولوژیک می‌افزاید. به‌این ترتیب امکان انتخاب مناسب درمان برای پزشک بیشتر می‌گردد. در حال، حاضر منابع معتبر میکروب‌شناسی بر مشاهده مستقیم نمونه‌های باکتریولوژیک تأکید می‌نمایند (۱۶)، این در حالی است که در آزمایشگاه‌های میکروب‌شناسی بالینی کمتر به این امر توجه شده است. چنانچه نتایج این تحقیق نشان داد، استفاده از لام مرطوب (قطره معلق) ۱۰ درصد بیش از نتیجه کشت باکتریایی تأیید کننده مننژیت است. در این خصوص سرعت عمل بالا در مدت زمانی اندک حداکثر ۱۰ دقیقه از مزایای تشخیصی بسیاری برخوردار است. افزون براین، در سال‌های اخیر استفاده از روش‌های تشخیص سریع و پیشرفته از جمله: Multiplex PCR و RT- PCR امکان تعیین اتیولوژی و نیز انتخاب آنتی بیوتیک در فاصله زمانی حدود ۳ تا ۴ ساعت مهیا شده است(۱۷). این امر هم برای پزشک و هم برای بیمار بسیار ارزشمند است. اما باید درنظر داشت، امکان بکار گیری روش‌های پیشرفته فوق برای تمام مراکز درمانی مقرون به‌صرفه نیست. لذا، استفاده از تکنیک مشاهده مستقیم و تهیه لام مرطوب (دیدن قطره معلق) تشخیص احتمالی مننژیت باکتریال را امکان پذیر می‌سازد. در هر حال، طی ۱۵ سال گذشته، پیشرفت‌های زیادی در زمینه تشخیص مولکولی عفونت‌های باکتریایی گزارش شده است (۱۸و ۱۹).

نتیجه گیری :

نتایج حاصل از کاربردهای روش‌های مولکولی هر چند رضایت‌بخش اما با تفاوت‌هایی همراه بوده است. دلایل متعددی برای آن ذکر شده است. یکی از مهم‌ترین آنها حساسیت فوق‌العاده روش‌مولکولی است. بنابراین وجود آلودگی در جریان عمل از دیگر موارد نامطلوب برای این روش است. در این تحقیق، تلاش همه‌جانبه‌ای انجام شد تا از بروز آلودگی نمونه‌ها در جریان عمل ممانعت به‌عمل آید. با این‌حال نمی‌توان آلودگی پرایمرها و نیز آنریم تک‌پلی‌مراز را نادیده گرفت. با وجود این در این تحقیق امکان تعیین آلودگی این مواد وجود نداشت. به‌علاوه پژوهشگران از پرایمرهای مختلف و تعداد چرخه‌های متفاوت برای انجام PCR استفاده کرده‌اند که می‌تواند دلیل مهمی برای این تغییرات باشد. این امر ضرورت انجام تحقیق بیشتری را طلب می‌کند.

فهرست مراجع:

1- Geiseler PJ, Nelson KE, Levin S, Reddi KT, and Moses VK. Community-acquired purulent meningitis: a review of 1316 cases during the antibiotic era, 1954–1976. *Rev Infect Dis* 1980; **2**:725–745.

2- Gorse GJ, Thrupp LD, Nudleman KL, Wyle FA, Hawkins B, and Cesario T C. Bacterial meningitis in the elderly. *Arch Intern Med* 1984; **144**:1603–1607.

3- Swartz MN, and Dodge PR. Bacterial meningitis—a review of selected aspects. *N Engl J Med* 1965; **272**:725–730.

4- Stroffolini T. Vaccination Campaign against meningococcal disease in army recruitsin Italy. *Epidemiol Infect* 1990; **105(3)**: 579– 583.

5- Gooya MM, Zahrai SM, Shirazi MR, and Nahid P. Information and Statistics of Contagous Diseases in Iran (1977 – 2002). 1st vol. Diseases Center. Seda publication, 2004 pp: 133-210.

6- Khwannimit B, Chayakul P, and Geater A. 2004. Acute bacterial meningitis in adults: a 20 year review. *Southeast Asian J Trop Med Public Health* 2004;**35(4)**:886-892.

7- La Scolea L, and Dryja D. Quantitation of bacteria in cerebrospinal fluid and blood of children with meningitis and its diagnostic significance. *J Clin Microbiol* 1984; **19**:187–190.

8- Phillips SE, and Millan JC. Reassessment of microbiology protocol for cerebrospinal fluid specimens. *Lab Med* 1991; **22**: 619–622.

9- Gray L, and Daniel FP. Laboratory Diagnosis of Bacterial Meningitis. *Clin Microbiol Rev* 1992; **5(2):** 130- 145.

10- Radstrom P, Backman A, Qian N, Kragsbjerg P, Pahlson N, and Olcen P. Detection of Bacterial DNA in Cerebrospinal Fluid by an Assay for Simultaneous Detection of *Neisseria meningitidis*, *Haemophilus influenzae*, and Streptococci Using a Seminested PCR Strategy. *J Clin Microbiol* 1994; **32(11):** 2738- 2744.

11- JihLu J, LihPerng C, Yilee S, and Chieng wan C. use of PCR with universal primer and restriction endonuclease digestion for detection and identification of common bacterial pathogens in CSF. *J Clin Microbiol* 2000; **38(6):** 2076- 2080.

12- Sambrook J. & David RW. Molecular cloning a laboratory manual. Gold Spring harbor laboratory press. 3rd ed. 2001;Vol 1. pp: 544 .

13- Boom R, Sol C J A, Salimans M M M, Jansen C L, Wertheim-van M E D, and Noordaa J van der. Rapid and Simple Method for Purification of Nucleic Acids. *J Clin Microbiol* 1990; **28(3):** 495- 503.

14- Stralin K, Backman A, Holmberg H, Fredlund H, Olcen P. Design of a multiplex PCR for *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*, *Mycoplasma pneumoniae* and *Chlamydophila pneumoniae* to be used on sputum samples. *APMIS* 2005; **113**:99–111.

15- Tzanakaki G, Tsopanomichalou M, Kesanopoulos K, Matzourani R, Sioumala M, Tabaki A, and Kremastinou J. Simultaneous single-tube PCR assay for the detection of *Neisseria meningitidis*, *Haemophilus influenzae* type b and Streptococcus pneumoniae. *Clin Microbiol Infect* 2005; **11**: 386–390.

16- Forbes, AB, Sahm FD, and Weissfield SA. Bailey & Scotts Diagnostic Microbiology. 11th ed. Mosby inc. Printed in the United State of Anerica, Philadephia, 2002; PP: 1069.

17- Espy MJ, Uhl JR, Sloan LM, Buckwalter SP, Jones MF, Vetter E A, *et al.* Real-Time PCR in Clinical Microbiology: Applications for Routine Laboratory Testing. *Clin Microbiol Rev* 2006; **19(1)**: 165–256.

18- Speers DJ**.** Clinical Applications of Molecular Biology for Infectious Diseases. *Clin Biochem Rev* 2006; **27**: 39-51.

19- Wolcott MR. Advances in Nucleic Acid-Based Detection Methods. *Clin Microbiol Rev* 1992; **5(4):** 370- 386.

مجله میکروب شناسی پزشکی ایران

سال ۱ شماره ۱ بهار ۱۳۸۶، مقاله کوتاه، صفحات ۶۷ – ۶۹

ارزیابی مقاومت آنتی بیوتیکی باسیلهای گرم منفی جدا شده از کودکان مراجعه کننده به بیمارستان کودکان مفید تهران

دکتر عبدالعزیز رستگارلاری*[۱] ، دکتر عبدالله کریمی[۲] ، شبنم رضوی[۱] ، دکتر سید حمید مصطفوی[۳] ، دکتر غلامحسین فرزندی[۳]

۱) گروه میکروبشناسی دانشگاه علوم پزشکی ایران ، تهران

۲) مرکز تحقیقات عفونی اطفال ، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران

۳) شرکت داروسازی اکسیر، تهران

نویسنده رابط: دکتر عبدالعزیز رستگارلاری ، گروه میکروبشناسی دانشگاه علوم پزشکی ایران ، تهران تلفن: ۸۸۰۵۸۶۴۹

تاریخ دریافت مقاله : ۸۶/۳/۲۰ تاریخ پذیرش مقاله : ۸۶/۴/۳

مقدمه :

سفوروکسیم[۱] از سفالوسپورنیهای نسل دوم است که همانند دیگر سفالوسپورین ها مانع سنتز دیواره باکتریها می شود و در برابر تعداد زیادی از میکروارگانیسم های عامل عفونت ، حتی مواردی که تولید کننده آنزیم بتالاکتاماز هستند (از جمله استافیلوکوک ها ، هموفیلوس، موراکسلا) ، خاصیت باکترسیدی دارد. همچنین این آنتی بیوتیک مقاومت خوبی در برابر آنزیمهای بتالاکتاماز مترشحه توسط انتروباکتریاسه ها بخصوص با منشاء پلاسمیدی را دارا می باشد.

با توجه به ظهور مقاومت های جدید برعلیه این دسته از آنتی بیوتیکها ، ضروری است که این آنتی بیوتیک فقط در موارد پیشگیری از عفونت و یا درمان بیماری های شدیدی که عامل باکتریایی دارد ، استفاده شود تا از بروز مقاومت های جدید در باکتریها جلوگیری گردد .

مصرف درمانی سفوروکسیم در عفونت های تنفسی فوقانی[۲] ، عفونت های پوستی[۳] و عفونت های ادراری[۴] از اهمیت خاصی برخوردار است . ارزیابی آزمایشگاهی حساسیت و مقاومت میکروارگانیسم های عامل عفونت در برابر این آنتی بیوتیک قبل از ورود به بازار مصرف می تواند ما را در تعیین استرتژی درمان یاری نماید.

مواد و روش ها :

هدف از این پژوهش ، تعیین عامل اتیولوژیک و میزان مقاومت به آنتی بیوتیک های مختلف می باشد. در این پژوهش بر روی ۱۵۰ سویه باکتری جدا شده از عفونت های مختلف ، مطالعه انجام گرفت . این باکتریها از بیماران بستری در بخش های اورژانس ، داخلی و عمومی و مراجعین به درمانگاه (غیر بستری) بیمارستان مفید کودکان در فاصله زمانی تیرماه تا اسفند۱۳۸۳ اخذ گردید.

تست تعیین حساسیت آنتی بیوتیکی (آنتی بیوگرام) به روش دیسک دیفوزیون ، توسط دیسک سفوروکسیم ساخت داخلی (با استفاده از پودر رفرانس استاندارد شرکت داروسازی اکسیر) و سفوروکسیم خارجی (ساخت شرکت HIMEDIA با غلظت ۳۰ μg در هر دیسک) صورت گرفت .

MIC این سویه ها نیز نسبت به سفوروکسیم ، سفتازیدیم ، سفیکسیم ، و آموکسی کلاو با توجه به استاندارد NCCLS تعیین گردید.

یافته ها:

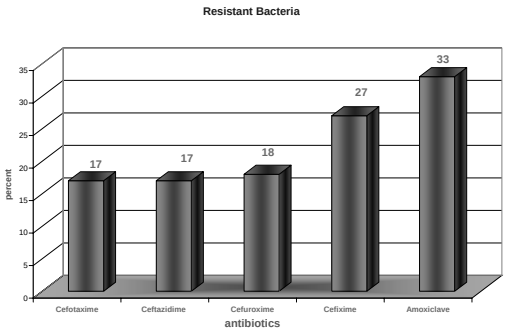
از ۱۵۰ نمونه مورد نظر ، ۶۳٪ متعلق به نمونه ادرار ، ۲۴٪ کشت خون ، ۹٪ نمونه زخم و آبسه و ۴٪ مربوط به کشت مدفوع می باشد.

باکتریهایی که از نمونه های کلینیکی جدا شدند عبارت بودند از : اشریشیا کلی ۵۱/۴٪ ، کلبسیلا ۱۳/۳ ٪ ، انتروباکتر ۱۵/۳ ٪ ، استافیلوکوک ۹/۳٪ ، پروتئوس ۳/۳٪ ، و سایر موارد ۷/۴٪ . از ۱۵۰ کودک مورد مطالعه ۶۱ ٪ پسر و ۳۹٪ دختر بودند.

مقاومت میکرواورگانیسم ها در برابر سفوروکسیم با استفاده از دیسک و متد آنتی بیوگرام ۱۸٪ بوده است . در صورتیکه میزان

مقاومت به این آنتی بیوتیک براساس تعیین حداقل غلظت مهاری (MIC) با استفاده از پودر رفرانس استاندارد شرکت داروسازی اکسیر برای نمونه خوراکی آن ۲۴٪ و برای نمونه تزریق آن ۱۷ ٪ می باشد .

از طرفی با استفاده از روش استاندارد NCCLS در تعیین مقاومت های داروئی در برابر بتالاکتامهای دیگر چون سفتازیدیم و سفوتاکسیم در مقایسه با سفوروکسیم نتایج مشابه ای را نسبت به سه آنتی بیوتیک فوق در برابر سوشهای آزمایش شده نشان میدهد.



نمودار شماره ۲

بحث :

با توجه به نتایج بدست آمده و مقایسه مقاومت سوشهای مورد مطالعه با استفاده از متد استاندارد ، مشاهده می شود که ۱۸٪ از سوشهای موردنظر به سفوروکسیم مقاومند، در حالیکه به سفالوسپورین های نسل سوم (سفوتاکسیم و سفتازیدیم) ۱۷٪ مقاومت نشان می دهد. با توجه به اینکه مقاومت نسبت به سفوروکسیم مشابه مقاومت به سفالوسپورین های نسل سوم است ، بنظر می رسد که استفاده از سفوروکسیم که یک آنتی بیوتیک خوراکی است، می تواند جایگزین سفالوسپورین های نسل سوم تزریقی گردد. این امر نشان دهنده تاثیر ضد باکتریائی بالای سفوروکسیم در برابر سوش های مورد مطالعه می باشد.

از طرفی آموکسی کلاو که مقاومت بالائی را در مقایسه با سفوروکسیم نشان می دهد (۳۳٪ در برابر ۱۸٪)، تاثیر آزمایشگاهی بهتر سفوروکسیم در برابر سوشهای مورد مطالعه را تائید می نماید.

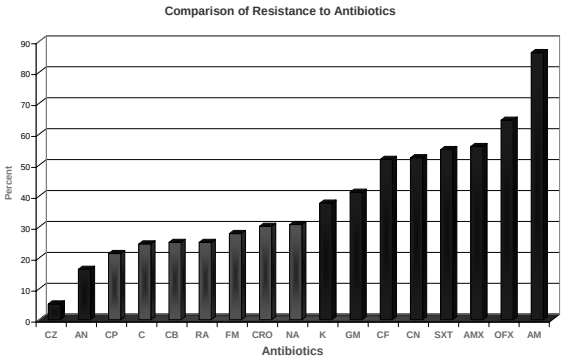
نتایج بدست آمده حاصل از تعیین حداقل غلظت مهاری (MIC) در برابر نمونه های خوراکی و تزریقی سفوروکسیم نشان میدهد که در نمونه تزریقی مقاومت این میکرواورگانیسم ها مشابه نتایج بدست آمده با استفاده از متد آنتی بیوگرام می باشد. در صورتیکه با استفاده از نمونه های خوراکی افزایش مقاومت مختصری را نسبت به نوع تزریقی نشان می دهد (۱۷٪ و ۲۴٪) ، که این تفاوت ناشی از اختلاف در حلالیت آنها در محیط کشت های میکروبی مورد مطالعه می باشد.

با توجه به نتایج حاصل از این مطالعه و تاثیر بالای سفوروکسیم نسبت به باکتریهای گرم منفی و گرم مثبت می توان از این آنتی بیوتیک در درمان عفونتهای حاصل از این باکتریها استفاده کلینیکی کرد(۱). به هرحال پزشکان باید در نظر داشته باشند که به منظور جلوگیری از بروز مقاومت های جدید ، به جز در موارد خاص از آنتی بیوتیک های وسیع الطیف در درمان عفونت ها استفاده ننمایند[۵].

نتایج بدست آمده حاصل از بررسی دیسک های تولید داخلی و خارجی و همچنین نتایج MIC آنها نشان دهنده استاندارد نبودن دیسک های تولید داخل است لذا توصیه می گردد شرکت های تولیدکننده آنتی بیوتیک در جهت ارزیابی بهتر فعالیت ضدباکتریائی آنتی بیوتیک ها در آزمایشگاه که نهایتا" درمان صحیح بیماران را بدنبال خواهد داشت ، تامین دیسک های استاندارد آنتی بیوتیک را مد نظر قرار دهند.

مقاومت میکرواورگانیسم ها در برابر آنتی بیوتیکهای آمپی سیلین ، کوتریموکسازول،نالیدیکسیک اسید، افلوکساسین، سیپروفلوکساسین، جنتامایسین، آمیکاسین، سفوروکسیم، سسفیکسیم ، سفتازیدیم ، و سفوتاکسیم به ترتیب عبارتست از : ۸۶٪ ، ۵۵٪ ، ۳۱٪ ، ۱۶٪ ، ۱۶٪ ، ۴۱٪ ، ۱۶٪ ، ۳۵٪ ، ۲۸٪ ، ۱۹٪ ، ۱۸٪(نمودار شماره ۱).

میزان مقاومت براساس تعیین حداقل غلظت مهاری (MIC) نسبت به سفوروکسیم ۲۴٪ ، سفتازیدیم ۱۷٪ ، سفوتاکسیم ۱۷٪ ، سسفیکسیم ۲۷٪ ، و آموکسی کلاو ۳۳٪ میباشد(نمودار شماره ۲)



نمودار شماره ۱

نتیجه گیری :

نتایج حاصل از این مطالعه با توجه به تاثیر بالای سفوروکسیم نسبت به باکتریهای گرام منفی و مثبت مورد مطالعه می تواند در درمان عفونت های حاصل از این باکتریها مورد استفاده کلینیکی قرار گیرد.

فهرست مراجع:

1. O’callaghan C, Sykes RB et al 1976.Cefuroxime, a new cephalosporin antibiotic: activity In vitro. Antimicrob agent & chemo.9 (3):511-519.
2. An Pediatr (Barc). 2007 Jun;66(6):578-84. [Clinicoepidemiological characteristics of community-acquired pneumonia in children aged less than 6 years old.] Giménez Sánchez F, Sánchez Marenco A, Battles Garrido JM, López Soler JA, Sánchez-Solís Querol M.
3. Indian J Pathol Microbiol. 2005 Jul;48(3):413-6. Bacteriological study of paediatric and adult chronic suppurative otitis media.Saini S, Gupta N, Aparna , Seema , Sachdeva OP.
4. .Niger J Med. 2006 Jul-Sep;15(3):230-6. Nosocomial and community acquired urinary tract infections at a teaching hospital in north central Nigeria: findings from a study of 12,458 urine samples.Jombo GT, Egah DZ, Banwat EB, Ayeni JA.
5. Pliego-Castaneda QF, Yanez-Viguri JA, Lopez-Valle T. . 2005 Multiresistant Pseudomonas spp. in vitro susceptibility to a combination of two antibiotics Cir Cir. Nov-Dec; 73(6):465-70.

مجله میکروب شناسی پزشکی ایران
سال ۱ شماره ۱ بهار ۱۳۸۶، مقاله کوتاه، صفحات ۷۱ – ۷۲

بررسی شیوع استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی سیلین (MRSA) در بیمارستان امیراعلم

دکتر مهرداد حسیبی*[۱]، بابک مهاجر ایروانی[۲]، دکتر مهناز سیفی[۳]، دکتر سیروس جعفری[۴]، دکتر محمد هادی زاده نیسانقلب[۱]، دکتر بزمان سعادت آملی[۱]

۱) بخش عفونی بیمارستان امیر اعلم
۲) آزمایشگاه میکروب شناسی ،بیمارستان امیر اعلم
۳) بخش میکروب شناسی انستیتو پاستور ایران
نویسنده رابط: دکتر مهرداد حسیبی، بخش عفونی بیمارستان امیر اعلم تلفن: ۰۹۱۲۳٤٥٨١٥٧

تاریخ دریافت مقاله : ۸٦/۳/۱ تاریخ پذیرش مقاله : ۸٦/۳/۲۲

استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی سیلین methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) علت اصلی و شناخته شده عفونت های بیمارستانی است (۱)، عفونت هایی که پس از ۴۸ ساعت از پذیرش بیمار در بیمارستان کسب می شوند و امروزه با عنوان Health care-associated MRSA (HA-MRSA) مشخص میشوند. از طرف دیگر در طول دهه اخیر گزارشات متعددی از عفونت ناشی از MRSA را در بیمارانی داشتیم که ارگانیسم ظرف ۴۸ ساعت اولیه پذیرش در بیمارستان از آنها جدا شده بود (۴-۲). این موارد در حقیقت (CA-MRSA) Community-associated MRSA هستند.

عفونت های CA-MRSA بر حسب ریسک تماس قبلی بیمار با MRSA در دو گروه الف) همراه با فاکتورهای خطر و ب) بدون فاکتورهای خطر قرار می گیرند که این فاکتورهای خطر عبارتند از: مصرف آنتی بیوتیک در طول ۳ ماه گذشته، سابقه بستری در بیمارستان ظرف یک سال گذشته، اقامت در خانه سالمندان در طول سال گذشته، ابتلا به بیماریهای مزمن شامل بدخیمی، نارسایی مزمن کلیوی و دیابت، اعتیاد تزریقی و تماس نزدیک با فردی که احتمال کلونیزاسیون پوستی یا حلقی MRSA در وی زیاد است (۶و۵و۲). در بیشتر اوقات، بیماران مبتلا به CA-MRSA حداقل یک فاکتور خطر جهت اکتساب مقاومت به متی سیلین را دارا هستند. در پاره ای از موارد نیز بیماران مبتلا به CA-MRSA هیچ فاکتور خطر شناخته شده ای ندارند که به نظر می رسد که شیوع این موارد نیز در طول یک دهه اخیر در حال افزایش باشد (۲).

با توجه به اهمیت عفونت MRSA در بیماران و مرگ و میر ناشی از آن لازم است مطالعه ای با هدف شناخت و تعیین شیوع این ارگانیسم در جامعه و بیمارستان انجام شود.

طی یک مطالعه مقطعی و آینده نگر که در بین سالهای ۱۳۸۲ تا ۱۳۸۴ در بیمارستان امیر اعلم انجام شد، ۴۱ نمونه MRSA از بیماران مبتلا به عفونت بالینی جدا گردید. محدوده سنی بیماران ۲۰/۴±۵۲/۵ سال بود. کلیه آزمایشات تعیین حساسیت میکروبی ایزوله ها در انستیتو پاستور ایران با استفاده از متد MIC (به روش Broth Microdilution) انجام شد. ۴۱ مورد MRSA از نمونه های کلینیکی خون (۵مورد)، ترشحات زخم (۱۶ مورد) ، نمونه کاتتر ورید مرکزی (۲ مورد)، ترشحات تنفسی (۸ مورد) و محتویات آبسه (۱۰ مورد) جدا گردید.

از ۴۱ مورد MRSA ایزوله شده، ۲۴ مورد (۵۸/۵ درصد) HA-MRSA بودند که زمینه های اکتساب MRSA در ۲۴ بیمار فوق عبارت بود از: بستری در ICU ۱۰ نفر(۴۱/۶درصد)، جراحی های پیچیده ۸ نفر (۳۳/۳ درصد)،بستری طولانی مدت در بیمارستان ۱۷ نفر(۷۰/۸ درصد)، وجود کاتتر مرکزی ۱۳ نفر(۵۴/۱ درصد)، مصرف نامناسب و طولانی مدت آنتی بیوتیک خصوصا در موارد پروفیلاکسی قبل از اعمال جراحی ۱۵ نفر (۶۲/۵درصد). آنتی بیوگرام هر ۲۴ ایزوله HA-MRSA ، تنها حساسیت به وانکومایسین را نشان می داد.

۱۷ مورد (۴۱/۵ درصد) ایزوله باقیمانده CA-MRSA بودند که در ۱۲ مورد (۷۰/۶ درصد) از این بیماران، حداقل یک فاکتور خطر

جهت کسب MRSA وجود داشت که شامل سابقه بستری در بیمارستان ظرف یکسال گذشته، سابقه مصرف آنتی بیوتیک ظرف ۳ ماه گذشته، نارسایی مزمن کلیوی، بدخیمی و اعتیاد تزریقی بود و تمام ۱۲ مورد تنها به وانکومایسین حساس بودند. در ۵ بیمار باقیمانده (۲۹/۴ درصد) هیچ گونه فاکتور خطر زمینه ای جهت کسب MRSA یافت نشد. این بیماران با تظاهرات آبسه گلوتئال، آبسه پستان و آبسه اربیت مراجعه کرده بودند و نکته جالب در آنتی بیوگرام این ۵ ایزوله MRSA، این بود که ایزوله ها نه تنها به وانکومایسین بلکه نسبت به کلیندامایسین نیز حساسیت نشان می دادند.

از ۱۰ بیمار مبتلا به CA-MRSA در بیمارستان اطفال دانشگاه شیکاگو ۵ نفر هیچ فاکتور خطر همراهی نداشتند (۷). در دو مطالعه گذشته نگر دیگر که در همان بیمارستان روی موارد MRSA انجام شد به ترتیب در ۱ نفر از ۸ بیمار مبتلا به عفونت CA-MRSA و ۲۵ نفر از ۳۵ بیمار مبتلا به CA-MRSA، هیچ فاکتور خطر زمینه ای جهت ابتلا به عفونت MRSA یافت نشد. بیماران فوق بدون داشتن هیچ عامل زمینه ای عفونت MRSA را از جامعه کسب کرده بودند (۲). در یک مقاله مروری که موارد CA-MRSA، از مطالعات مختلف مورد آنالیز قرار داده بود مشخص شد که ۸۵٪ موارد CA-MRSA حداقل یک فاکتور خطر داشتند۸).

نتایج مطالعه ما نشان داد که:

۱) شیوع عفونت های ناشی از CA-MRSA که دارای فاکتورهای خطر زمینه ای هستند، روبه افزایش است.

۲) شیوع عفونت های ناشی از CA-MRSA (نزدیک به ۳۰٪) که هیچ فاکتور خطر زمینه ای شناخته شده ای ندارند، در حال ازدیاد است.

۳) هیچ موردی از مقاومت استافیلوکوکوس اورئوس نسبت به وانکومایسین گزارش نشد.

با توجه به نتایج فوق پیشنهاد می شود:

۱) در برخورد با بیمارانی که با تشخیص احتمالی عفونت استافیلوککی در بیمارستان بستری می شوند سوابق پزشکی آنها کاملا" بررسی شود تا در صورت شک به MRSA درمان empiric مناسب تجویز شود.

۲) با توجه به افزایش شیوع موارد MRSA اکتسابی از جامعه که دارای فاکتورخطر نیز نیستند، لازم است استراتژی های پیشگیرانه در توقف این روند، که یک معضل بزرگ بهداشتی است اتخاذ گردد.

۳) لازم است جهت پایش دقیق وضعیت این ارگانیسم مطالعاتی با فاصله زمانی معین و با حجم نمونه بیشتر انجام شود، تا همواره بتوان ارزیابی دقیقی از وضعیت شیوع و مقاومت این ارگانیسم در بیماران ارائه داد.

کلمات کلیدی: استافیلوکوکوس اورئوس، مقاومت آنتی بیوتیکی، عفونت بیمارستانی، MRSA، CA-MRSA

فهرست مراجع:

1. Brumfitt W, Hamilton-Miller JM. The worldwide problem of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Drugs Exp Clin Res* 1990; **16**: 205-214.
2. Herold BC, Immergluck LC, Maranan MC, Lauderdale DS, Gaskin RE, Boyle-Vavra S, *et al*. Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in children with no identified predisposing risk. *JAMA* 1998; **279**: 593-598.
3. Berman DS, Eisner W, Kreiswirth B. Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infection. *N Engl J Med* 1993; **329**: 1896.
4. Pate KR, Nolan RL, Bannerman TL, Feldman S. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in the community. *Lancet* 1995; **346**: 978.
5. Salgado CD, Farr BM, Calfee DP. Community-acquired methicillin-resistant Staphylococcus aureus: a meta-analysis of prevalence and risk factors. *Clin Infect D*is 2003; **36**: 131-139.
6. Gorak EJ, Yamada SM, Brown JD. Community-acquired methicillin resistant *Staphylococcus aureus* in hospitalized adults and children without known risk factors. *Clin Infect Dis* 1999; **29**: 797-800.
7. Hussain FM, Boyle-Vavra S, Bethel CD, Daum RS. Current trends in community-acquired methicillin-resistant Staphylococcus aureus at a tertiary care pediatric facility. *Pediatr Infect Dis J* 2000; **19**:1163-1166.
8. 8. Beam JW, Buckley B. Community-Acquired Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus: Prevalence and Risk Factors. *J Athl Train 2006*; **41**: 337-340.